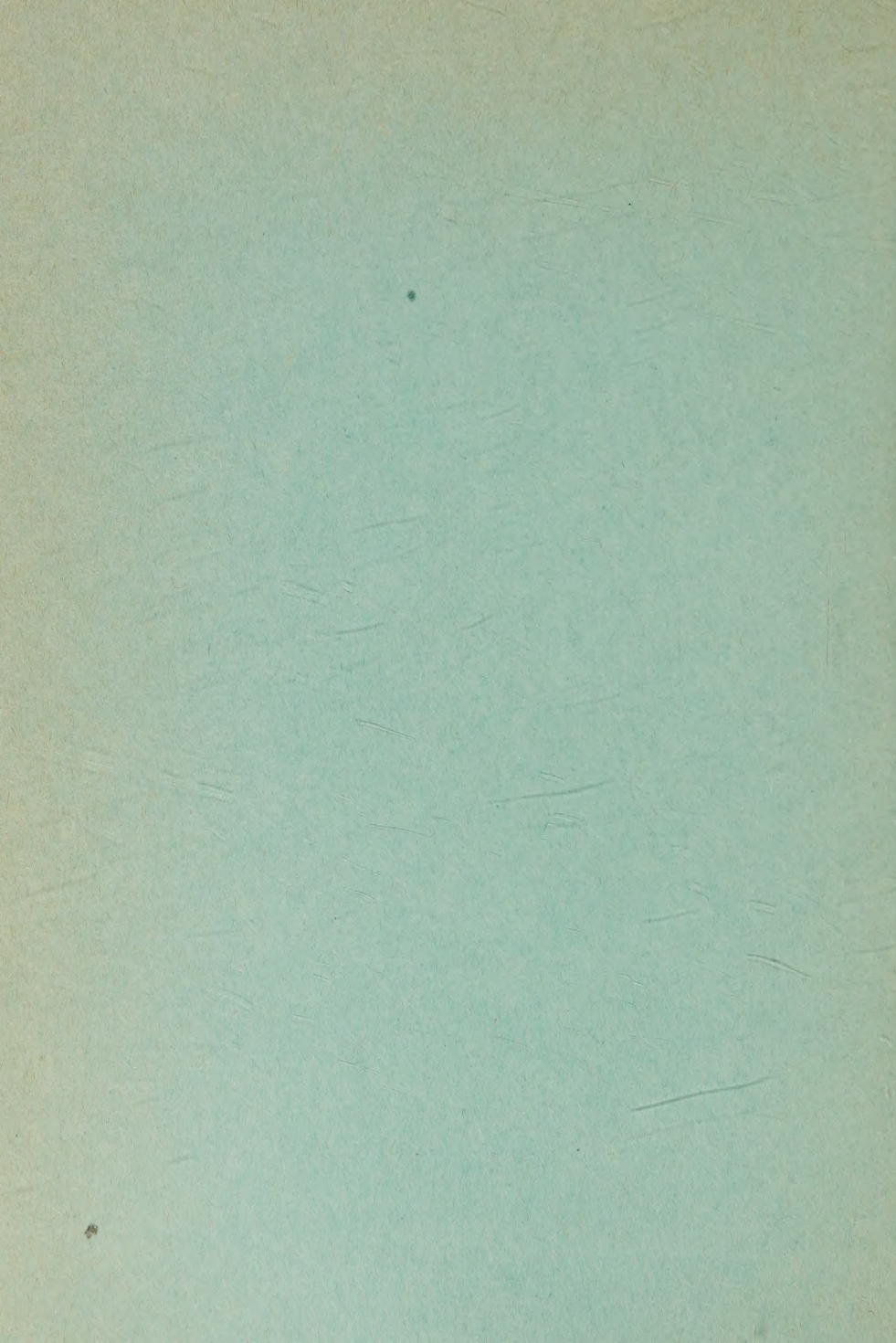


**ZUR QUALITÄTSKONTROLLE UND METHODISCHEN
RATIONALISIERUNG IN DER KLINISCHEN CHEMIE**

Ingo Marschner

1971



AUS DER II.MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

KOMM.DIREKTOR : PROF.DR. M. M. FORELL

ZUR QUALITÄTSKONTROLLE UND METHODISCHEN RATIO-
NALISIERUNG IN DER KLINISCHEN CHEMIE.*

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
VERFASST UND EINER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN
VORGELEGT

von Ingo Marschner

aus

Tetschen-Bodenbach

1970

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft
(SFB 51).



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. P. C. Scriba

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. M. Forell

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 1. 7. 1971

MEINEN ELTERN

1	1.1.1	1.1.1
2	1.1.2	1.1.2
3	1.1.3	1.1.3
4	1.1.4	1.1.4
5	1.1.5	1.1.5
6	1.1.6	1.1.6
7	1.1.7	1.1.7
8	1.1.8	1.1.8
9	1.1.9	1.1.9
10	1.1.10	1.1.10
11	1.1.11	1.1.11
12	1.1.12	1.1.12
13	1.1.13	1.1.13
14	1.1.14	1.1.14
15	1.1.15	1.1.15
16	1.1.16	1.1.16
17	1.1.17	1.1.17
18	1.1.18	1.1.18
19	1.1.19	1.1.19
20	1.1.20	1.1.20
21	1.1.21	1.1.21
22	1.1.22	1.1.22
23	1.1.23	1.1.23
24	1.1.24	1.1.24
25	1.1.25	1.1.25
26	1.1.26	1.1.26
27	1.1.27	1.1.27
28	1.1.28	1.1.28
29	1.1.29	1.1.29
30	1.1.30	1.1.30
31	1.1.31	1.1.31
32	1.1.32	1.1.32
33	1.1.33	1.1.33
34	1.1.34	1.1.34
35	1.1.35	1.1.35
36	1.1.36	1.1.36
37	1.1.37	1.1.37
38	1.1.38	1.1.38
39	1.1.39	1.1.39
40	1.1.40	1.1.40
41	1.1.41	1.1.41
42	1.1.42	1.1.42
43	1.1.43	1.1.43
44	1.1.44	1.1.44
45	1.1.45	1.1.45
46	1.1.46	1.1.46
47	1.1.47	1.1.47
48	1.1.48	1.1.48
49	1.1.49	1.1.49
50	1.1.50	1.1.50
51	1.1.51	1.1.51
52	1.1.52	1.1.52
53	1.1.53	1.1.53
54	1.1.54	1.1.54
55	1.1.55	1.1.55
56	1.1.56	1.1.56
57	1.1.57	1.1.57
58	1.1.58	1.1.58
59	1.1.59	1.1.59
60	1.1.60	1.1.60
61	1.1.61	1.1.61
62	1.1.62	1.1.62
63	1.1.63	1.1.63
64	1.1.64	1.1.64
65	1.1.65	1.1.65
66	1.1.66	1.1.66
67	1.1.67	1.1.67
68	1.1.68	1.1.68
69	1.1.69	1.1.69
70	1.1.70	1.1.70
71	1.1.71	1.1.71
72	1.1.72	1.1.72
73	1.1.73	1.1.73
74	1.1.74	1.1.74
75	1.1.75	1.1.75
76	1.1.76	1.1.76
77	1.1.77	1.1.77
78	1.1.78	1.1.78
79	1.1.79	1.1.79
80	1.1.80	1.1.80
81	1.1.81	1.1.81
82	1.1.82	1.1.82
83	1.1.83	1.1.83
84	1.1.84	1.1.84
85	1.1.85	1.1.85
86	1.1.86	1.1.86
87	1.1.87	1.1.87
88	1.1.88	1.1.88
89	1.1.89	1.1.89
90	1.1.90	1.1.90
91	1.1.91	1.1.91
92	1.1.92	1.1.92
93	1.1.93	1.1.93
94	1.1.94	1.1.94
95	1.1.95	1.1.95
96	1.1.96	1.1.96
97	1.1.97	1.1.97
98	1.1.98	1.1.98
99	1.1.99	1.1.99
100	1.1.100	1.1.100

Mein Dank gilt besonders

Herrn Priv. Doz. Dr.med. P.C. SCRIBA für die Überlassung des Themas, für seine unermüdliche Hilfe und Kritik,

Herrn Dr.med. K. HORN für die Erstellung der Rechenprogramme, die für die Verwertung der Labordaten wesentlich waren,

den Medizinisch-Technischen Assistentinnen des Labors 184 der II. Med. Universitätsklinik München für die gewissenhafte Durchführung der Qualitätskontrollen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>
1	1
1.1	Allgemeines
1.1.1	Zur Ausgangssituation
1.2	Methoden und Möglichkeiten der Qualitätskontrolle im klinisch-chemischen Laboratorium
1.2.1	Über Fehler
1.2.2	Begriffe und Auswertungsverfahren
1.2.2.1	Richtigkeit
1.2.2.2	Richtiger Wert
1.2.2.3	Präzision
1.2.2.4	Mittelwert
1.2.2.5	Standardabweichung
1.2.2.6	Variationskoeffizient
1.2.2.7	Zuverlässigkeit
1.2.3	Kontrollgrenzen
1.2.4	Möglichkeiten der praktischen Durchführung
1.2.4.1	Präzisionskontrolle
1.2.4.1.1	Wäßrige Kontrolllösungen
1.2.4.1.2	Eiweißhaltige Kontrollproben
1.2.4.1.3	Serumpool
1.2.4.1.4	Serum vom Vortag
1.2.4.1.5	Käufliche Kontrollseren
1.2.4.2	Richtigkeitskontrolle
1.2.4.2.1	Primäre Standards
1.2.4.2.2	Standardproben
1.2.4.2.3	Kontrollproben
1.2.5	Einfluß der Teilschritte bei der Gewinnung klinisch-chemischer Befunde auf das Ergebnis
1.3	Überblick über die Arbeit
1.3.1	Millilitermethoden - Schweineblut
1.3.2	Schweineblut - pathologischer Bereich
1.3.3	Neuorganisation des Labors
1.3.3.1	Mikrolitersystem Eppendorf

	Seite
1.3.3.2	Kunststoffmaterial 26
1.3.4	Aufteilung der Arbeitsplätze 27
1.3.5	Qualitätskontrolle 28
1.3.5.1	II. Ringversuch 28
1.3.5.2	Kontrollseren von DADE 29
1.3.6	Das Problem der Erkennung von Fehlern I. und II. Art 29
1.3.6.1	Tägliche Berechnung von $\bar{N}$ (Arbeitsplatzzettel) 29
1.3.6.2	Verhalten von $\bar{N}$ zur Präzisions- kontrolle 31
1.3.6.3	Grenzen der Werte, die zur Berechnung von $\bar{N}$ herangezogen werden 32
1.3.7	"Öffentliche" Qualitätskontrolle 33
<u>2</u>	<u>METHODEN UND ERGEBNISSE,</u>
	<u>SPEZIELLE DISKUSSION</u> 35
2.1	Organisation der Blutannahme und Serumverteilung 36
2.2	Traktat über den Umgang mit Mikro- literpipetten "Marburg" 40
2.3	Methoden, die im Milliliterverfahren und im Mikroliterverfahren kontrol- liert wurden 43
2.3.1	Kreatininbestimmung in Serum und Urin 44
2.3.1.1	Kreatinin - Milliliterverfahren 44
2.3.1.2	Kreatinin - Mikroliterverfahren 48
2.3.1.3	Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Kreatininbestimmung und Bemerkungen 52
2.3.2	Bestimmung der Harnsäure im Serum 56
2.3.2.1	Harnsäure - Milliliterverfahren 56
2.3.2.2	Harnsäure - Mikroliterverfahren 59
2.3.2.3	Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Harnsäure-Analyse und Bemerkungen 62
2.3.3	Bestimmung von Phosphor in Serum und Harn 65
2.3.3.1	Phosphor - Milliliterverfahren 65
2.3.3.2	Phosphor - Mikroliterverfahren 69
2.3.3.3	Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Phosphor-Analyse und Bemerkungen 72

2.3.4	Bestimmung von Cholesterin im Serum	74
2.3.4.1	Cholesterin - Milliliterverfahren	74
2.3.4.2	Cholesterin - Mikroliterverfahren	78
2.3.4.3	Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Cholesterin-Analyse und Bemerkungen	80
2.3.5	Die Bestimmung der Elektrolyte Natrium, Kalium und Calcium im Serum mit dem Zeiss Flammenphotometer PF 5	83
2.3.5.1	Methodik	83
2.3.5.2	Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Elektrolytbestimmung und Bemerkungen	87
2.3.6	Die Bestimmung des Eisens im Serum	94
2.3.6.1	Eisen - Milliliterverfahren	94
2.3.6.2	Eisen - Mikroliterverfahren	98
2.3.6.3	Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Eisen-Analyse und Bemerkungen	100
2.3.7	Veresterte Fettsäuren im Serum	102
2.3.8	Die Bestimmung der β -Lipoproteide	104
2.3.8.7	Bemerkungen zur Bestimmung von veresterten Fettsäuren und β -Lipoproteiden	106
<u>2.4</u>	<u>Methoden, an denen nichts geändert wurde</u>	108
2.4.1.1	Die Bestimmung des Serumeiweiß mit dem ABBE'-Refraktometer	109
2.4.1.2	Eiweiß in Serum und Liquor - Biuret-Methode	110
2.4.1.3	Qualitätskontrolle der Gesamteiweißbestimmungen und Bemerkungen	115
2.4.2.1	Die Bestimmung von Harnstoff-Stickstoff im "Technicon"-Autoanalyser	117
2.4.2.2	Die Bestimmung von Harnstoff-Stickstoff im Serum mit der BERTHELOT-Reaktion	121
2.4.2.3	Die Harnstoff-Stickstoff-Bestimmung mit dem Urastrat-Stick	125
2.4.2.4	Ergebnisse der Qualitätskontrolle aus der Harnstoff-Stickstoff-Bestimmung mit dem "Technicon"-Autoanalyser	127
2.4.3.1	Mikroglucosebestimmung mit dem "Technicon"-Autoanalyser	130
2.4.3.2	Bestimmung der Glucose im Blut - UV-Test mit NADP (Mikrolitermethode)	134
2.4.3.3	Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Glucosebestimmung mit dem "Technicon"-Autoanalyser und Bemerkungen	137

2.4.4	Serum- und Liquor-Elektrophorese auf Zelluloseacetatfolien	139
2.4.4.1	Methodik	139
2.4.4.2	Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Serum-Elektrophorese und Bemerkungen	143
<u>2.5</u>	<u>Methoden, bei denen nur die neuen Mi- kroliterverfahren kontrolliert wurden</u>	144
2.5.1	Konjugiertes und gesamtes Bilirubin im Serum - Mikroliterverfahren	145
2.5.1.1	Methodik	145
2.5.1.2	Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Bilirubin-Analyse und Bemerkungen	148
2.5.2	Die Bestimmung der Transaminasen GOT und GPT	151
2.5.2.1	Methodik	151
2.5.2.1.4.1	Grundsätzliches zur Berechnung der Enzymaktivitäten	155
2.5.2.2	Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Transaminasen-Aktivitäts-Bestimmung und Bemerkungen	158
2.5.3	Die Bestimmung der Aktivität der LDH im Serum	163
2.5.3.1	Methodik	163
2.5.3.2	Ergebnisse der Qualitätskontrolle der LDH-Aktivitäts-Bestimmung und Bemerkungen	165
2.5.4	Die Bestimmung der HBDH im Serum	166
2.5.4.1	Methodik	166
2.5.4.2	Ergebnisse der Qualitätskontrolle der HBDH-Bestimmung und Bemerkungen	168
2.5.5	Die Bestimmung der APH im kinetischen Test	169
2.5.5.1	Methodik	169
2.5.5.2	Ergebnisse der Qualitätskontrolle der APH-Aktivitäts-Bestimmung und Bemerkungen	171
2.5.6	Die Bestimmung der SPH im Serum	174
2.5.6.1	Methodik	174
2.5.6.2	Ergebnisse der Qualitätskontrolle der SPH-Aktivitäts-Bestimmung und Bemerkungen	176
2.5.7	Die Bestimmung der LAP-Aktivität im Serum	177

	Seite
2.5.7.1	Methodik 177
2.5.7.2	Ergebnisse der Qualitätskontrolle der LAP-Aktivitäts-Bestimmung und Bemerkungen 179
2.6	<u>Abhängigkeit der Prothrombinzeit von der Calcium- und H - Ionenkonzentra- tion und Beschreibung eines neuen pho- toelektrischen Verfahrens zur Bestim- mung des Quick-Wertes</u> 180
2.6.1	Methodik 181
2.6.1.1	Visuelle Handmethode 181
2.6.1.2	Quickwert-Bestimmung mit dem Coagulation-Unimeter der Firma Bio Dynamics Inc. 183
2.6.2	Ergebnisse 189
2.6.3	Spezielle Diskussion 191
2.6.3.1	Nachteile der klassischen Arbeitsweise nach Quick
2.6.3.2	Vorteile der elektro-optischen Methode
3.1	Diskussion 194
3.2	Zusammenfassung 197
3.3	Literaturverzeichnis 198

Liste der im Text verwendeten Abkürzungen* und
Enzyme-Commission-Nummern der Enzyme (aus BARMAN, 3).

APH	- alkalische Phosphatase (Orthophosphor-Monoester-Phosphohydrolase, EC 3.1.3.1)
ATP	- Adenosintriphosphat
CHE	- Cholinesterase (Acetylcholinhydrolase, EC 3.1.1.7)
CPK	- Kreatinphosphokinase (ATP: Kreatinphosphotransferase, EC 2.7.3.2)
E	Extinktion
GLDH	- Glutamat-Dehydrogenase (L-Glutamat: NAD Oxidoreduktase, EC 1.4.1.2)
GOT	- Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (L-Asparat: 2-Oxoglutarat-Aminotransferase, EC 2.6.1.1)
GPT	- Glutamat-Pyruvat-Transaminase (L-Alanin: 2-Oxoglutarat-Aminotransferase, EC 2.6.1.2)
G-6-PDH	- Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (D-Glucose-6-Phosphat: NADP-Oxidoreduktase, EC 1.1.1.49)
HBDM	- α -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (als LDH-Isoenzym unter EC 1.1.1.27)
HK	- Hexokinase (ATP: D-Hexose-6-Phosphotransferase, EC 2.7.1.1)
LAP	- Leucin-Amino-peptidase (L-Leucyl-Peptid-Hydrolase, EC 3.4.1.1)
LDH	- Lactat-Dehydrogenase (L-Lactat: NAD-Oxidoreduktase, EC 1.1.1.27)
MDH	- Malat-Dehydrogenase (L-Malat: NAD-Oxidoreduktase, EC 1.1.1.37)
NAD	- Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	- Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

*) Statistische Symbole siehe Seite 9 ff, (Teil 1.2).

P.korr. - mit dem Ergebnis der Präzisionskontrollprobe (P) jedes Tages wurde folgende Rechnung durchgeführt:

$$P \cdot \frac{\text{Sollwert}}{\text{MR}} = \text{korrigiertes P.}$$

(MR = Mittelwert der beiden Analysenergebnisse der Richtigkeitskontrollprobe für jeden Tag).

Serie - Kontrolle innerhalb einer Serienbestimmung (eines Analysenansatzes).

T.T. - Kontrolle von Tag zu Tag

U - Unit, Enzymeinheit (auch IU = International Unit oder IE = internationale Einheit). Nach der Empfehlung der International Union of Biochemistry (IUB) bezeichnet 1U diejenige Enzymmenge, die unter Standardbedingungen den Umsatz von 1 μmol Substrat pro Minute bewirkt. Standardbedingungen: 25°C (IUB-Empfehlung 1961), 30°C (IUB-Empfehlung 1964), wenn möglich optimaler p_{H} -Wert und optimale Substratkonzentration (aus 67).

Urease - Harnstoff-Aminohydrolase, EC 3.5.1.5

Uricase - Urat: Sauerstoff-Oxidoreduktase, EC 1.7.3.3

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeines

Wie die steigende Anzahl von geforderten Untersuchungen im klinisch-chemischen Laboratorium zeigt (9 , 58, 99), gewinnt diese Arbeit für die Diagnostik zunehmend an Bedeutung. Dabei ist ein Teil der Methoden im Prinzip über Jahrzehnte gleich geblieben (Kreatinin, Harnsäure, Bilirubin), andere (Weltmann, Takata) sind gegen brauchbarere und vielseitigere ausgetauscht worden (Elektrophorese), während ein großer Teil (enzymatische Substrat- und Enzymaktivitätsbestimmungen) erst in den letzten beiden Jahrzehnten Eingang in die tägliche Routine gefunden hat (Abb. 1).

Da eine exakte Erfassung der Arbeitszuwachsrate durch totale Auszählung der Einzelleistungen der jeweiligen Jahre unmöglich ist, muß man sich mit Stichproben begnügen. Für das klinisch-chemische Labor der II.Medizinischen Universitätsklinik in München wurden dazu sämtliche Laborleistungen einer bestimmten Stichwoche (beginnend jeweils mit dem ersten Montag nach dem 6. Januar) in jedem der vergangenen sieben Jahre gezählt. Dabei ergab sich folgendes Bild:

Jahr	1964	1965	1966	1967	1968	1969	1970
Zahl d.Bestimmungen pro Woche	1738	1661	1716	2183	2189	2289	3424
prozentuale Zunahme von Jahr zu Jahr	----	-4,4	+3,3	+9,8	+0,2	+4,6	+49,5
prozentuale Zunahme v.1964 an gerechnet	----	-4,4	-1,1	+25	+26	+32	+97

Trotz des schleichenden Arbeitszuwachses zwischen 1964 und 1968 (Grund siehe 1.1.1) zeigt sich doch - besonders durch eine 1969 begonnene Modernisierung des Labors - eine Verdoppelung der Leistungen innerhalb von sechs Jahren,

was mit den Angaben von KNEDEL (99; ". . . Verdoppelung alle 5 Jahre . . . ") in etwa übereinstimmt.

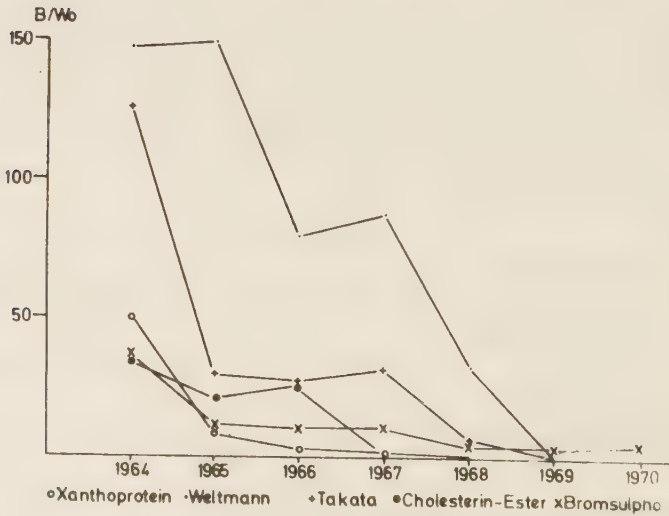
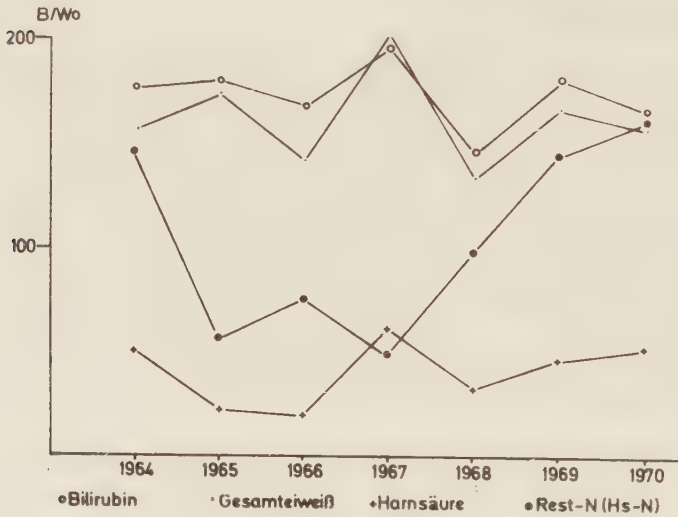


Abb. 1a : Für einzelne repräsentative Methoden wurde die Zahl der Analysen in einer bestimmten Woche (beginnend mit dem ersten Montag nach dem 6. Januar) in jedem der letzten sieben Jahre ausgezählt. Obwohl die Zahlen einer

Woche nicht reichen, um genaue Wachstums- oder Abnahmeraten zu errechnen, sind doch die einzelnen Tendenzen deutlich zu erkennen. Oben: Methoden, die im wesentlichen zahlenmäßig über die letzten Jahre gleich geblieben sind. Unten: Methoden, die ganz oder fast ganz aus der klinischen Chemie verschwunden sind.

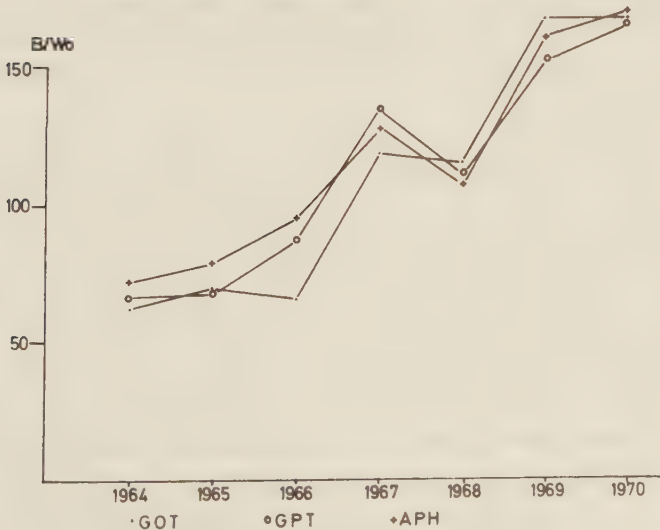
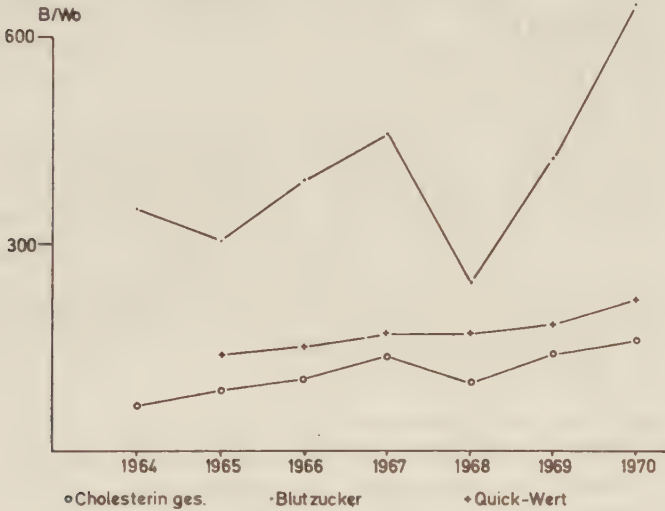


Abb. 1b : Methoden, deren Anzahl an Bestimmungen pro Woche in den letzten Jahren stark angewachsen ist.

Angesichts dieser Tatsache ist eine Steigerung der Kapazität eines klinisch-chemischen Labors grundsätzlich auf drei Wegen möglich:

- Mehr Personal. Diese Möglichkeit wird unter anderem sehr schnell durch die räumlichen Gegebenheiten begrenzt.
- Rationellere manuelle Techniken. Hier liegt im Augenblick das größte Gewicht (9, 110).
- Automation (9, 58, 103, 124, 170). Sie hat in die meisten Labors bereits Einzug gehalten. Die verschiedensten Wege sind von seiten der Industrie beschritten worden - ein großer Teil befindet sich im Versuchsstadium. Für die Zukunft liegt hier die eleganteste und wichtigste Lösung zur Beherrschung des Problems der Arbeitszuwachsrate (74).

Unabhängig davon besteht seit jeher von Klinik und Labor der Wunsch nach möglichst verlässlichen Ergebnissen. Auch hier sind große Anstrengungen zur Standardisierung und Normierung von Reagenzien, Methoden und Normalbereichen unternommen worden (29, 125), denn bei den meisten Serumbestandteilen sind die Normalbereiche von der praktizierten Nachweismethode abhängig. Doch nicht nur das: auch Blutentnahmemodus, Tageszeit und Ernährung spielen unter anderem eine entscheidende Rolle. Was lag also näher, als durch eine Vereinheitlichung der Methodik diese Faktoren zu kompensieren. Trotz starker Bestrebungen, vor allem in den USA, schlugen diese Versuche fehl. Gute Erfolge und Erfahrungen mit der "angestammten" Methode oder Modifikation und vor allem die zahlreichen modernen Entwicklungsrichtungen in der klinischen Chemie (Automaten, Mikroliterverfahren) standen dem entgegen. Mehr Erfolg hatte der Weg, gewisse Zuverlässigkeitskriterien für die einzelnen Analysen von Serumbestandteilen zu erheben und gleichzeitig ausführliche Beschreibungen von Methoden zu liefern, die diese Normen erfüllen (125). "Diese Zuverlässigkeitskriterien sind nach dem derzeitigen Stand unseres Wissens nur aus Prä-

zisions- und Richtigkeitskontrolle . . . zu gewinnen. Sie sind eine unabdingbare Voraussetzung für den Vergleich von Methoden" (BÜTTNER, H. und D. STAMM, 29).

Von seiten des Gesetzes liegen seit Juli 1969 zusätzliche Anforderungen in Form des neuen Eichgesetzes vor, denen entweder durch Verwendung amtlich geeichter Geräte oder durch statistische Qualitätskontrolle der Untersuchungen sowie Teilnahme an Ringversuchen Rechnung getragen werden muß. Schon vorher, im April 1968, veranstaltete die Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie unter der Leitung von Priv. Doz. Dr. Dr. STAMM erstmals einen Ringversuch über Qualitätskontrolle (148), der den sich beteiligenden Labors exakte Unterlagen über Wert und Reproduzierbarkeit ihrer Ergebnisse vermitteln sollte. Nebenher begannen immer mehr Laboratorien größerer Kliniken, vornehmlich an Universitäten, mit verschiedenen Verfahren (siehe unten) Richtigkeit und Präzision ihrer Analysen zu überprüfen. Über die ersten Erfahrungen und Ergebnisse des klinisch-chemischen Laboratoriums der II. Medizinischen Universitätsklinik in München mit Methoden der Qualitätskontrolle soll hier im wesentlichen berichtet werden.

1.1.1 Zur Ausgangssituation

Im August 1968*, zu Beginn meiner Arbeit, wurden in diesem Labor 25 Substrate und 9 Enzyme routinemäßig quantitativ bestimmt. Davon wurde der größte Teil (15 Substrate und 4 Enzyme) im Milliliterverfahren nach colorimetrischen Methoden am Photometer Eppendorf analysiert. Harnstoff-Stickstoff und Blutzucker liefen über

*) Bis zu diesem Zeitpunkt waren Versuche, die Klinische Chemie zu modernisieren, an dem Finanzierungsproblem gescheitert.

den Technicon-Autoanalyzer, für Harnstoff-Stickstoff und Blutzucker war außerdem für den Nachtdienst noch der Urastrat-Teststreifen (21, 71) zur Hand. Für die Erfassung des Gesamteiweißes stand ein Zeiss-Refraktometer zur Verfügung, für die Elektrolyte, Natrium, Kalium und Calcium, ein Zeiss-Flammenphotometer. Der Prothrombinindex wurde nach der klassischen Quick-Methode ermittelt. 5 Enzyme erfaßte man kinetisch im UV-Test mit Photometer Eppendorf und Philips-Kompensations-schreiber. Zur Durchführung aller Analysen in einfachem Ansatz wären insgesamt 28 ml Serum nötig gewesen, die bei 10 min Zentrifugieren mit 2200 x g etwa aus 70 ml Patientenblut zu gewinnen sind.

Meine Aufgabe bestand zunächst darin, die praktizierten Methoden schriftlich zu fixieren und für die wichtigsten und häufigsten Methoden ("screening-Methoden") eine statistische Qualitätskontrolle einzuführen.

1.2 Methoden und Möglichkeiten der Qualitätskontrolle im klinisch-chemischen Laboratorium

1.2.1 Über Fehler

Grundsätzlich können Ergebnisse auf zwei verschiedene Arten vom wahren Wert differieren. Einerseits können Mehrfachwerte zu stark streuen, andererseits kann zwar die Streuung klein, das Niveau der Werte aber nach oben bzw. unten vom richtigen Ergebnis verschoben sein. Jeder Teilschritt der Analytik ist mit Fehlerquellen behaftet (28, 29, 33), die ihre Ursachen z.B. in der Unzulänglichkeit der Manipulationen des Analytikers, der Methodik, der menschlichen Sinnesorgane und der apparativen Möglichkeiten haben (152). Man bezeichnet sie, einschließlich der Fehler bei der Probevorbereitung, als Meßfehler, die nach der Fehlertheorie in drei Gruppen eingeteilt werden (Abb.2) :

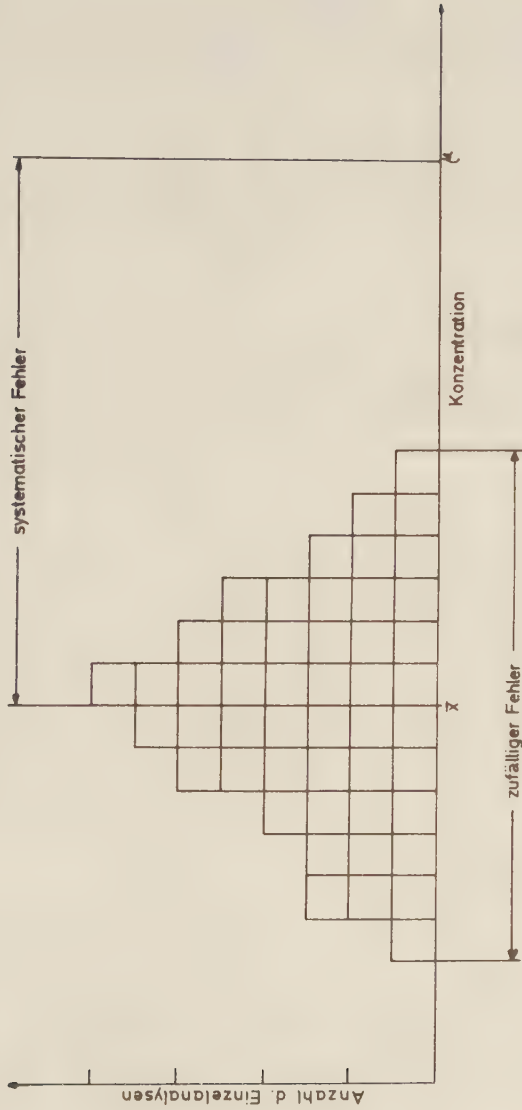


Abb. 2 : Graphische Darstellung zur Verdeutlichung der Begriffe "systematischer" und "zufälliger" Fehler bei chemischen Analysen. Die einzelnen Quadrate bezeichnen einzelne Analysenergebnisse. μ = wahrer Wert, $\bar{x}$ = Mittelwert der Einzelergebnisse, (aus BÜTTNER, H. 28).

1.2.1.1 Systematische Fehler:

Alle Meßwerte weichen in einer Richtung, d.h. systematisch vom wahren Wert ab. Beispiel: Bei der Aufstellung einer Eichkurve für eine photometrische Analyse wird eine unreine Substanz verwendet; dann liegen alle über diese Eichkurve ermittelten Analysenergebnisse systematisch zu hoch. Ähnliche Beispiele sind Fehler infolge unzureichender Monochromasie des Meßlichtes oder infolge falsch zusammengestellter Reagenzien. Auch die Fehler durch unzureichend zusammengesetzte Standardlösungen gehören hierher.

1.2.1.2 Zufällige Fehler:

Alle Meßwerte streuen mehr oder minder um einen Mittelwert, positive und negative Abweichungen sind gleich häufig, kleine Fehler sind wahrscheinlicher als große; dies gilt aber nur, wenn die Fehler normal verteilt sind. Jeder Schritt der chemischen Analyse ist mit mehr oder weniger großen zufälligen Fehlern behaftet, die sich nach der Gauß'schen Fehlerfortpflanzungs-Theorie zum Gesamtfehler addieren. Beispiel: Beim Pipettieren treten kleine Unregelmäßigkeiten beim Einstellen des Meniskus oder Unterschiede in der Wartezeit beim Entleeren der Pipette auf. In diese Gruppe gehören Gerätefehler (inkonstante Thermometer, Photometerdrift), Verschleppungsfehler, Reagenzienveränderungen (auch unterschiedliche Qualität des destillierten Wassers) und nicht zuletzt Faktoren wie schwankende Zimmertemperatur, Luftfeuchtigkeit und Lichteinstrahlung.

1.2.1.3 Grobe Fehler:

Sie sind meistens durch grobe Unachtsamkeit des Analytikers bedingt und können prinzipiell vermieden werden, z.B. Verwechslungen von Volumina, Reagenzien und Photometerfiltern.

1.2.2 Begriffe und Auswertungsverfahren

Die Definitionen der folgenden Begriffe sind wegen ihrer Klarheit und im Interesse einer einheitlichen Nomenklatur der grundlegenden Arbeit von BÜTTNER und STAMM : "Qualitätskontrolle klinisch-chemischer Untersuchungen" (29) entnommen.

1.2.2.1 Richtigkeit:

Der systematische Fehler läßt sich in einfacher Weise als Differenz zwischen dem gefundenen Mittelwert ($\bar{x}$) und dem richtigen Wert μ (der natürlich nur in beliebig genauer Näherung erfaßbar ist) darstellen. Beispiel siehe 1.2.2.2 . Je größer der systematische Fehler, um so geringer ist die Richtigkeit, und umgekehrt.

1.2.2.2 Richtiger Wert:

Genau bekannte Konzentration einer Probe. Beispiel: Man wiegt von bis zur Gewichtskonstanz getrocknetem Harnstoff p. a. 30,0 mg in einen 100-ml-Meßkolben ein, füllt bis zur Marke mit ammoniakfreiem bidestilliertem Wasser auf und kontrolliert den Gehalt z.B. mit einer hinreichenden Anzahl von KJELDAHL-Bestimmungen, bevor man die Richtigkeit einer enzymatischen Harnstoffbestimmung mit dieser Lösung (primärer Standard) prüft.

1.2.2.3 Präzision (Streubreite):

Die zufälligen Fehler lassen sich nur erfassen, wenn man die Messung der gleichen Größe oder die Analyse der gleichen Probe mehrfach durchführt. Je größer der zufällige Fehler, desto stärker "streuen" die Einzelergebnisse, destogeringer ist die Präzision der Messung. Die quantitative Angabe der zufälligen Fehler ist nur mit den unten definierten statistischen Meßzahlen Mittelwert und Standardabweichung oder dem Variationskoeffizienten mög-

lich. Die Präzision in der Serie, die man durch mehrfache Analysen der gleichen Probe in einer Untersuchungsserie ermittelt, ist meist wesentlich besser als die Präzision von Tag zu Tag, die man durch mehrfache Analysen der gleichen unveränderten Probe an verschiedenen Tagen ermittelt.

1.2.2.4 Mittelwert:

Als die Kenngröße des besten Wertes aus einer Anzahl von streuenden Meßwerten gilt der Mittelwert ($\bar{x}$):

$$\text{I} \quad \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

$\sum_{i=1}^n$ = Summe aller Zahlen von x_1 bis x_n
 x_i = Meßwert
 n = Zahl der Meßwerte

1.2.2.5 Standardabweichung:

Als die beste Kenngröße für die Streuung von Meßwerten um einen Mittelwert ($\bar{x}$) gilt die Standardabweichung s . Sie kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{II} \quad s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Für Tischrechenmaschinen ist die folgende Umformung von II unter Zuhilfenahme von I geeigneter:

$$\text{III} \quad s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2}{n \cdot (n-1)}}$$

1.2.2.6 Variationskoeffizient:

In vielen Fällen ist es anschaulicher, die Streuung in Prozent des Mittelwertes anzugeben, wenn man Streuungen aus verschiedenen Meßwertreihen vergleichen will. Diese Größe nennt man den Variationskoeffizienten VK (%).

$$\text{IV} \quad \text{VK} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

1.2.2.7 Zuverlässigkeit:

Die Zuverlässigkeit ist der Oberbegriff für Präzision und Richtigkeit. Im Sinne der Qualitätskontrolle spricht man von Zuverlässigkeit, wenn die Ergebnisse einer Analysenmethode in ihrer Präzision und Richtigkeit mit bestimmter Wahrscheinlichkeit vorausgesagt werden können, d.h. wenn das Analysenverfahren unter Kontrolle ist (Abb. 3).

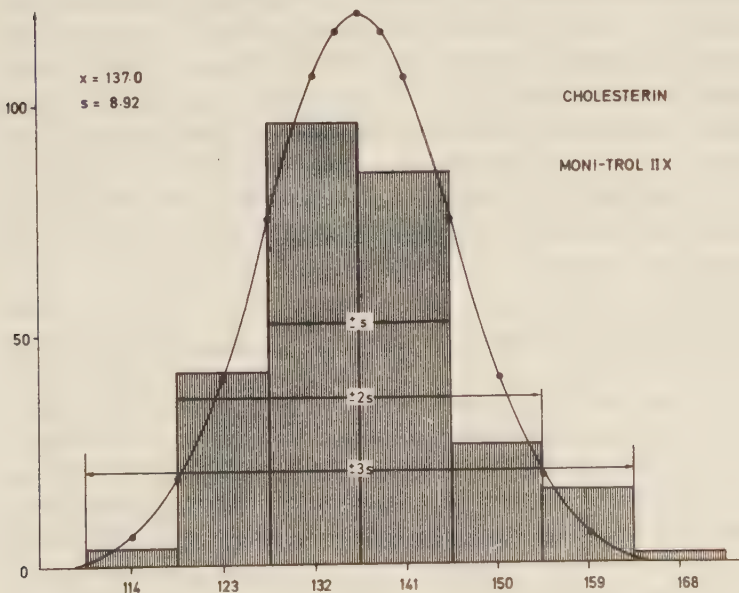


Abb. 3 : Verteilung der Ergebnisse von 270 Cholesterinanalysen in Moni-Trol II X (Mikroliterverfahren) im Häu-

figkeitsdiagramm. Die Ergebnisse wurden grob nach ihrer Lage in den s-Grenzen klassifiziert. Darüber die nach der Gleichung

$y = 0,4 \cdot e^{-\frac{z^2}{2}}$ berechnete Normalverteilungskurve.
(Verwendet man die Standardnormalverteilung, so setzt man z an die Stelle von s) (128).

Wie die Abbildung zeigt, ist ein Fehler um so häufiger, sein Erscheinen also um so wahrscheinlicher, je kleiner er ist. Der Fehler Null ist am wahrscheinlichsten. Liegt eine Normalverteilung vor, so kann eine derartige Fehlerverteilungskurve durch zwei Parameter, den Mittelwert μ und die Standardabweichung σ , angegeben werden. Diese Größen beschreiben die Grundgesamtheit, angedeutet durch die griechischen Buchstaben. In der Qualitätskontrolle bilden die Analysenergebnisse jedoch immer nur eine (u.U. sehr kleine) Stichprobe aus der Grundgesamtheit, und die genannten Parameter μ und σ lassen sich aus einer Stichprobe nicht exakt berechnen, sie können nur mit den genannten Verfahrensweisen für die Berechnung von Mittelwert ($\bar{x}$ für μ) und Standardabweichung (s für σ) abgeschätzt werden. Dies gibt jedoch besonders bei Stichproben von weniger als 20 Werten keine fehlerfreie ("biasfreie") Schätzung. Der Fehler kann jedoch durch Multiplikation von s mit einem Faktor (67) korrigiert werden.

1.2.3 Kontrollgrenzen, Fehler I. und II. Art (28)

Diese Begriffe lassen sich am besten an einem Beispiel aus der Industrie erklären. Man nehme folgenden Fall an: Die Qualität eines in Massenproduktion hergestellten Werkstückes ist von einem kritischen Durchmesser abhängig, der den Wert μ haben muß. Durch das "stabile System zufälliger Ursachen" treten jedoch bei der maschinellen Produktion Schwankungen auf, die bis zu dem Wert $\mu \pm \sigma$ toleriert werden können. Da eine Stück-für Stück-Kontrolle zu teuer und aufwendig wäre, werden Stichpro-

ben aus m Werkstücken untersucht. Der Mittelwert der Meßgröße μ einer Stichprobe sei $\bar{x}$. Der springende Punkt des Kontrollsystems ist nun, mit statistischen Methoden die Hypothese zu testen, daß $\mu = \bar{x}$ ("Nullhypothese") ist, was mit folgender Formel ermöglicht wird:

$$v \quad \} = \frac{\bar{x} - \mu}{\sigma} \cdot \sqrt{m}.$$

μ = vorgegebener Mittelwert

$\bar{x}$ = Mittelwert der Stichprobe

σ = vorgegebene Streuung des Prozesses

m = Anzahl der Einzelstücke der Stichprobe

Überschreitet $\}$ für eine Stichprobe einen Wert λ , so wird die Hypothese abgelehnt, d.h. die Stichprobe entspricht nicht mehr den festgesetzten Anforderungen. Eine derartige Entscheidung beinhaltet eine gewisse Irrtumswahrscheinlichkeit, die durch geeignete Wahl von λ so klein wie erforderlich gehalten werden kann. Wählt man λ so, daß die Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 1\%$ ist, dann bedeutet das, daß bei einer von hundert Stichproben die Entscheidung "Werkstück nicht in Ordnung" falsch ist. Neben dieser Art der Fehlentscheidung, bei der die zu prüfende Hypothese fälschlicherweise abgelehnt wird (Fehler I.Art), kommt bei statistischen Entscheidungen noch der gegenteilige Fall vor, bei dem die Hypothese fälschlicherweise nicht abgelehnt wird (Fehler II.Art). Das würde bedeuten, daß im vorliegenden Beispiel die Fehlerhaftigkeit der Werkstücke einer Serie nicht bemerkt wird. Die Irrtumswahrscheinlichkeit für Fehler II.Art hängt von der Festlegung der Kontrollgrenzen (also λ) und der Anzahl der Einzelstücke in der Stichprobe ab. Fehler II.Art sind um so häufiger, je größer λ (d.h. also, je seltener Fehler I.Art sind) und je kleiner m ist.

Den geschilderten statistischen Signifikanztest

führt man nach SHEWHART (144) auf einfachste Weise graphisch aus, wozu eine Kontrollkarte gezeichnet wird (Abb. 4).

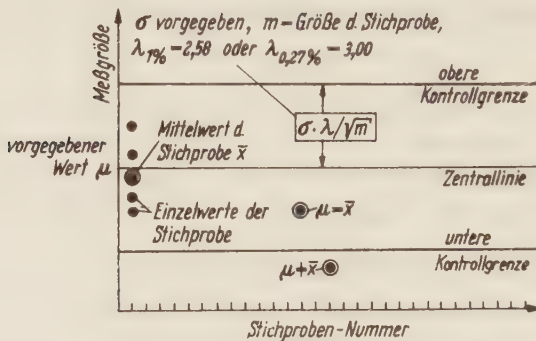


Abb. 4 : Konstruktion einer Mittelwert-Kontrollkarte (siehe. Text). (Aus BÜTTNER, H., 28.)

Die Abszisse dieser Kontrollkarte gibt die Stichprobennummer an, die Ordinate ist eine Skala für die als Qualitätsmeßgröße verwendete Variable. Der vorgegebene Wert μ wird als horizontale Linie (Zentrallinie) eingezeichnet. Die Mittelwerte der Stichproben ($\bar{x}$) werden nun in zeitlicher Reihenfolge in das Diagramm eingetragen. Zur Durchführung des statistischen Tests sind die Kontrollgrenzen wichtig. Diese liegen, wie sich aus Gleichung V für die Testgröße ergibt, bei

$$VI \quad \mu - \lambda \frac{\sigma}{\sqrt{m}} \quad \text{und} \quad \mu + \lambda \frac{\sigma}{\sqrt{m}} .$$

Liegt der Mittelwert einer Stichprobe zwischen den beiden Grenzen, so ist mit der durch λ festgelegten Irrtumswahrscheinlichkeit $\mu = \bar{x}$.

Auf die Klinische Chemie angewandt, ergibt sich die Frage der zweckmäßigsten Festlegung der Kontrollgrenzen

(28). Wie oben gezeigt, werden die Fehler I. und II. Art in einem Qualitätskontrollsystem durch die Lage der Kontrollgrenzen festgelegt. Fehler I. Art bedeuten "falschen Alarm", d.h. die Analysenmethode wird fälschlicherweise als "außer Kontrolle" bezeichnet. Diese Fehlentscheidungen verursachen dem Labor unnötige Kosten. Liegen die Kontrollgrenzen bei $\pm 3 \sigma$, so treten Fehler I. Art etwa einmal im Vierteljahr, bei $\pm 2 \sigma$ etwa alle drei Wochen auf. Wir einigten uns deshalb auf eine Festlegung der Kontrollgrenzen bei $\pm 2,6 \sigma$ (99% der Standardnormalverteilung).

Von Fehlern II. Art spricht man, wenn nicht bemerkt wird, daß die Analysen außer Kontrolle sind, wenn also falsche Ergebnisse das Labor verlassen. Da gerade diese Fehler am Krankenbett verhängnisvoll sein können, sollte darauf Wert gelegt werden, sie so gering wie möglich zu halten. Fehler II. Art sind abhängig von der Lage der Kontrollgrenzen (je enger diese liegen, desto besser) und von der Größe der Stichproben, d.h. von der Anzahl der Einzelanalysen, die in einer Serie an einer Kontrollprobe gemacht werden. Besteht die Kontrolle in einer Serie nur aus einer Einzelanalyse, so ist die Irrtumswahrscheinlichkeit für Fehler II. Art besonders groß. In der Praxis sind zur Verminderung der Fehler II. Art folgende Möglichkeiten zu diskutieren:

- 1) Alle Kontrollanalysen werden als Doppel- oder Dreifachanalysen ausgeführt.
- 2) Kontrollgrenzen bei 2σ statt bei 3σ (Nachteil: häufig falscher Alarm mit seinen psychologischen Folgen).
- 3) Kombination aufeinanderfolgender Kontrollwerte zu Zweier- oder Dreiergruppen (sog. gleitendes Mittel, vergleiche Formel VI).
- 4) Kontrolle des Mittelwertes der Normalwerte aus den Routineanalysen jedes Tages (siehe unten).

KREATININ MILLILITERVERF.

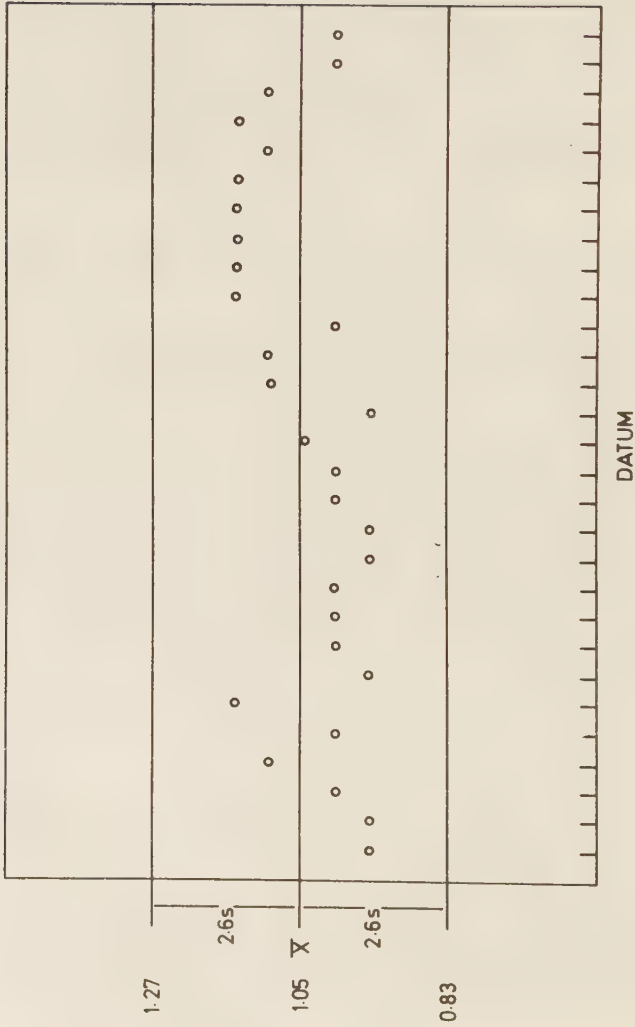


Abb. 5 : Kontrollkarte für Kreatinin, Milliliterverfahren. Die eingetragenen Punkte sind die Mittelwerte aus den täglichen Doppelwerten.

H. BÜTTNER (28) stellte an ein optimales Qualitätskontrollsystem folgende Forderungen:

- " 1) Überwachung der zufälligen Fehler = Präzisionskontrolle.
- 2) Überwachung der systematischen Fehler = Richtigkeitskontrolle.
- 3) Überwachung von Trends.
- 4) Kontrolle über den gesamten Konzentrationsbereich.
- 5) Kontinuierliche Anwendbarkeit.
- 6) Abweichungen sofort erkennbar.
- 7) Anwendbarkeit auch für automatische Analysen.
- 8) Arbeitsaufwand und Kosten in vertretbaren Grenzen.
- 9) Durchführbarkeit mit nicht speziell geschultem Personal."

Desgleichen fordert er von einem Minimalprogramm der Qualitätskontrolle im klinisch-chemischen Labor folgendes:

"Prinzip: In jeder Serie eine Analyse einer konstanten unbekannten Kontrollprobe.

Kontrollprobe: Selbsthergestellter Serumpool oder Kontrollserum.

Durchführung:

- 1) In jeder Serie eine Kontrollprobe analysieren.
- 2) Nach etwa 20 Serien Mittelwert und Streuung berechnen.
- 3) $\bar{x}$ -Kontrollkarten anlegen.
- 4) Die in jeder Serie ermittelten Kontrollwerte in die Kontrollkarte eintragen.

Das Prinzip sollte sein, daß Befunde nur dann das Labor

verlassen, wenn die entsprechende Kontrollkarte dies zuläßt. Der Leiter des Laboratoriums kann überdies wertvolle Informationen bekommen, wenn die Kontrollkarten etwa am Ende eines Monats statistisch ausgewertet werden (Berechnung des Monatsmittels, der Streuung usw.)".

1.2.4 Möglichkeiten der praktischen Durchführung

Zu einer wirkungsvollen Überwachung der Analytik müssen von der Standardisierung unabhängige Kontrollen durchgeführt werden. Für die statistische Qualitätskontrolle sind nun die verschiedensten Wege mit unterschiedlichem Erfolg beschritten worden. Grundsätzlich kann mit einer Kontrolllösung unbekannten Substratgehaltes (sekundärer Standard) zwar die Präzision einer Methode, nicht aber deren Richtigkeit überprüft werden.

1.2.4.1 Zur Durchführung einer Präzisionskontrolle eignen sich:

1.2.4.1.1 Wäßrige Kontrollösungen (sekundäre Standards) unbekannter, aber konstanter Konzentration eines Substrates oder mehrerer Substrate. Nachteilig wirken sich die geringe Haltbarkeit mancher Bestandteile (Bilirubin) und die Gefahr der Verdunstung des Lösungsmittels bei längerem Stehen aus. Infolge des Fehlens von Eiweiß wird die große Fehlerkomponente des Enteiweißens nicht mit erfaßt; das Ergebnis ist eine zu günstige Präzision.

1.2.4.1.2 Eiweiß- (Albumin-) haltige Kontrollproben mit mehreren Bestandteilen. Sie entsprechen den analysierten Proben weitgehend. Ihre Herstellung ist relativ teuer und umständlich.

1.2.4.1.3 Ein Serumpool.

Tierserum: Man bezieht aus dem Schlachthof frisches Rinder- (oder besser Schweine-)blut, zentrifugiert, mischt das gewonnene Serum und verteilt mit einem geeigneten Dispensiergerät genügend große Portionen in verschließbare

Gefäße. Zur Erhöhung der Haltbarkeit werden diese Portionen bei -30°C bis zum Gebrauch tiefgefroren. Täglich durchläuft ein solches (aufgetautes) Serum den Analysengang der zu kontrollierenden Methoden zusammen mit den Patientenseren. Diese Methode ist beliebt, weil sie billig und einfach ist und im Gegensatz zum Humanserum-pool die Gefahr der Infektion mit Hepatitisviren vermeidet (22).

Humanserum (29): Ebenso wirtschaftlich ist das Anlegen eines eigenen Mischserums in der folgenden Weise: In einer Plastikflasche, die in einer Tiefkühltruhe verwahrt wird, sammelt man das von der Analytik übriggebliebene Serum, soweit es frei von Hämolyse, Lipämie, hohem Bilirubingehalt und die Analytik störenden Arzneimitteln ist. Wenn zwei bis drei Liter zusammen sind, taut man bei Raumtemperatur auf, mischt gründlich, zentrifugiert 30 Minuten und mischt den Überstand erneut. Dieses homogene Gemisch verteilt man wie oben beschrieben.

1.2.4.1.4 Analyse eines Serums vom Vortage:

Eines oder mehrere übriggebliebene Seren, aus denen Doppelbestimmungen durchgeführt wurden, werden getrennt eingefroren und am nächsten Tag in den normalen Analysengang der gleichen Methoden wieder eingeschleust. Das Verfahren ist umständlich, die Ergebnisse sind zum Teil wenig befriedigend (155).

1.2.4.1.5 Käufliche flüssige oder lyophilisierte (gefrier-getrocknete) Kontrollseren unbekannten, aber für eine Chargennummer konstanten Gehaltes. Es werden von der Industrie die verschiedensten Zusammenstellungen angeboten. Die lyophilisierten Kontrollproben müssen nach Auflösen mit bidest. Wasser entweder unmittelbar verbraucht oder in Portionen tiefgefroren werden. Die Auflösung ist mit einer Reihe von zufälligen Fehlern behaftet. Dies ist zwar die genaueste und bequemste, aber auch die teuerste Methode der Präzisionskontrolle und eignet sich deshalb nur für Mikrolitermethoden.

Nach einer Vorperiode von 20 bis 30 Tagen, an denen in Doppelbestimmungen Werte für die entsprechenden Kontrolllösungen ermittelt wurden, errechnet man nach den angegebenen Formeln Mittelwert und Standardabweichung. An Hand der beiden Ergebnisse eliminiert man zunächst die zwei oder drei Werte, die über den $\pm 2,6 s$ Bereich hinausgehen (Ausreißer), und errechnet aus dem Rest der Ergebnisse erneut Mittelwert und Standardabweichung. Dadurch verhindert man, daß durch eventuell in der Vorperiode aufgetretene ungewöhnlich große zufällige Fehler die Kontrollgrenzen zu weit gesteckt werden. Dieses Eliminierungsverfahren darf bei einer Serie von Meßergebnissen allerdings nur einmal durchgeführt werden. Dann legt man die Kontrollkarten an. Eine Methode ist dann "unter Kontrolle", wenn das Ergebnis der Präzisionskontrolllösung im Bereich von $\bar{x} \pm 2,6 s$ liegt.

1.2.4.2 Für die Richtigkeitskontrolle eignen sich:

1.2.4.2.1 Primäre Standards:

Standardlösungen von bekannter Konzentration einer bestimmten Substanz, hergestellt unter größtmöglicher Sorgfalt, durch Einwaage der chemisch definierten und möglichst reinen Substanz in optimal geeignetem Lösungsmittel.

1.2.4.2.2 Standardproben:

Ein Standard von bekannter Konzentration einer bestimmten Substanz, der weitere Bestandteile enthält (Eiweiß) und dadurch in seiner Zusammensetzung den analysierten Proben ähnelt.

1.2.4.2.3 Kontrollproben:

Die routinemäßige Richtigkeitskontrolle ist die große Domäne der käuflichen Kontrollseren, da diese in ihrer Zusammensetzung weitgehend den analysierten Proben ähnlich sind. Die auf der beigelegten Anweisung aufgeführten Konzentrationen der einzelnen Bestandteile sind die Mittelwerte aus den Ergebnissen zahlreicher qualifizier-

ter Laboratorien und sind zum Teil nach Analysenmethoden aufgeschlüsselt.

1.2.5 Einfluß der Teilschritte bei der Gewinnung klinisch-chemischer Befunde auf das Ergebnis.

Für die Prüfung der Zuverlässigkeit von Befunden muß man die Teilschritte von der Probennahme am Patienten bis zur Übermittlung des Befundes an den behandelnden Arzt studieren. Alle Teilschritte sind einer Vielzahl von Einflüssen und Störungen ausgesetzt. (Siehe Abb. 6.)

BÜTTNER und STAMM (29) fanden nun, daß der Anteil der Probennahme und Verwahrung an der Gesamtstreuung meist größer ist als der der Analytik selbst. Diese Tatsache erschwert natürlich zusätzlich die Vergleichbarkeit von Befunden aus verschiedenen Laboratorien. Um diese Störfaktoren aus dem nichtanalytischen Bereich erforschen und ausschalten zu können, ist eine gründliche Kontrolle der Analyse selbst natürlich Voraussetzung. Weiterhin bedarf es fundierter Kenntnisse der Normalbereiche in Abhängigkeit von Entnahmetechnik (Material, Zahl der Einstiche), Tagesrhythmus, Jahresrhythmus, Geschlecht, Alter, medikamentöser Therapie und Ernährung.

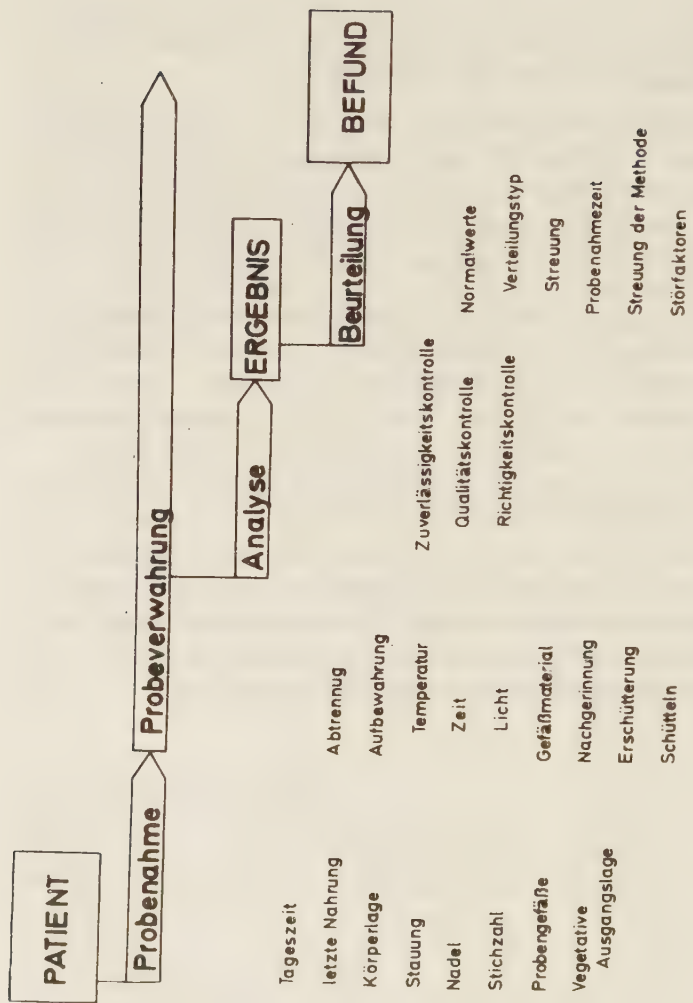


Abb. 6 : Teilschritte bei der Gewinnung klinisch-chemischer Befunde. Unter jedem Teilschritt sind die Störeinflüsse oder die Kontrollmöglichkeiten eingetragen. (Aus BÜTTNER, H. und D.STAMM, 29.)

1.3 Überblick über die Arbeit

1.3.1 Schweineserumpool:

Nachdem sich das klinisch-chemische Labor der II.Medizinischen Universitätsklinik in München an dem I.Ringversuch der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie beteiligt hatte, bestand die Absicht, ein ständiges Kontrollsystem für möglichst viele Methoden einzurichten. Da für die vorhandenen Millilitermethoden - wie angedeutet - sehr viel Serum verbraucht wurde und von der Routine kaum etwas übrig blieb, schied die Anlage eines Humanserumpools aus, und es kam nur Tierblut in Frage. Wir entschieden uns für Schweineblut, da das Schwein wegen seiner vielseitigeren Nahrung in der Zusammensetzung seines Blutes dem Menschen ähnlicher ist als das Rind. Das Blut wurde im Schlachthof direkt aus der Vena jugularis des Schweines mit einem Litergefäß aufgefangen und auf je vier 250 ml fassende PVC-Zentrifugengefäße (Martin Christ, Osterode, Harz) verteilt. Mit 20 Gefäßen, die durch Parafilm verschlossen wurden, konnten auf diese Weise jeweils 5 l Blut abgeholt werden. Auf dem Weg vom Schlachthof zur Klinik setzte die Gerinnung ein, so daß im Labor sofort mit dem Zentrifugieren begonnen werden konnte (20 min bei 2200 xg). Das gewonnene Serum wurde in ein 3-l-Gefäß abgegossen, gemischt und nochmals 15 min bei 2200 xg nachzentrifugiert, um übergeschwemmte Erythrozyten, die beim Einfrieren des Serums platzen würden, zu entfernen. Das nochmals vorsichtig dekantierte Serum wurde wieder gemischt, mit einer Pipette in Portionen von 18 ml in Reagenzgläser verteilt, mit Parafilm verschlossen und bei -27° C in einer Tiefkühltruhe eingefroren. In einer Vorperiode von 23 Arbeitstagen ermittelten die Assistentinnen des Labors im Rahmen der täglichen Routine für folgende Methoden Doppelwerte: Gesamteiweiß (Refraktometer), Cholesterin, Harnsäure, Kreatinin, Phosphor, Blutzucker und Harnstoff-Stickstoff. Danach wurde durch die angegebenen Verfahren Mittelwert und Standardabweichung

errechnet und die Kontrollkarten gezeichnet. Diese Kontrollperiode lief drei Monate (Ergebnisse siehe bei den jeweiligen Methoden).

1.3.2 "Pathologisches" Schweineserum:

Parallel dazu unternahm ich einen Versuch mit drei Methoden (Harnstoff-Stickstoff, Kreatinin und Harnsäure), um die Präzisionskontrolle auch auf den pathologischen Bereich auszudehnen: Durch Einwaage entsprechender Mengen Reinsubstanz wurde die Konzentration im Schweineserum an Kreatinin auf das Zehnfache, die für Harnstoff und Harnsäure auf das Dreifache der physiologischen Konzentration gebracht. Dieses "pathologische" Schweineserum wurde filtriert und in gleicher Weise, jedoch in geringeren Portionen (8 ml) aufgeteilt und tiefgefroren. Hiermit wurden an insgesamt 40 Arbeitstagen Doppelanalysen durchgeführt. Die Ergebnisse waren zum Teil wenig befriedigend (siehe Methodenteil).

1.3.3 Neuorganisation des Labors:

Der Grund dafür, daß die Präzisionskontrolle mit Schweineserum nur so kurz durchgeführt wurde, lag darin, daß man sich entschlossen hatte, die Arbeitsmethoden, die im wesentlichen aus der Zeit stammten, in der Professor Dirr und später Professor Wieland die Leitung innehatten, im Rahmen der gegebenen finanziellen und personellen Möglichkeiten schrittweise dem analytischen Fortschritt anzupassen. Anschließend sollte die Qualitätskontrolle neu aufgebaut werden.

1.3.3.1 Mikrolitersystem:

Unter dem großen Spektrum moderner Analysenverfahren, das die Industrie für die klinisch-chemische Routine bietet (110), erschien uns das Mikrolitersystem Eppendorf (Netheler und Hinz, Hamburg) für unsere Gegebenheiten

das günstigste, da hierbei, im Hinblick auf die jährliche Arbeitszuwachsrate, viele manuelle Methoden nach Bedarf und ohne große Schwierigkeiten auf Halbautomaten (digitaler Meßplatz) und Automaten (Endpunktautomat, Enzymstraße) zu adaptieren sind.

Tatsächlich sind die Vorteile dieses Systems gegenüber dem herkömmlichen Arbeiten mit Glasgeräten gravierend. Um nur wenige zu nennen:

- Für die Analysen werden ein Zehntel bis ein Fünftel der bisherigen Serummenge gebraucht.
- Im gleichen Maßstab verringern sich die Kosten für Reagenzien, was besonders bei enzymatischen Methoden von Bedeutung ist.
- Durch die Verwendung von spurenfreien Einmalgefäßen und Einmalpipettenspitzen sind Verunreinigungen des Ansatzes durch ungenügende Sauberkeit bzw. Detergentienrückstände in Glasgeräten vermieden.
- Die pipettierte Volumina sind bei exakter Handhabung und sachgemäßer Pflege der Mikroliterpipetten wesentlich konstanter und genauer als bei Verwendung von Glaspipetten.
- Die Analysen sind durch raumsparende Bauweise der Geräte und höhere Leistungsfähigkeit (z.B. Zentrifuge 15000 x g) sowie durch das praktische Zubehör (Reagensentnahmeflaschen, Wechsellaufsätze, Rüttler, Küvettenwechselautomat) wesentlich rationaler und schneller auszuführen.
- Durch die geringen Probevolumina ist natürlich auch eine Qualitätskontrolle mit käuflichen Kontrollseren wesentlich billiger.

Innerhalb eines halben Jahres erprobte ich nun Mikrolitermethoden für die erforderlichen Enzym- und Substratanalysen und überprüfte ihre Richtigkeit teils mit primären Standards und teils mit Kontrollseren (Moni-

Trol^R, Patho-Trol^R, Enza-Trol^R der Fa. Dade). Bewährte sich eine Methode durch ausreichende Richtigkeit, Reproduzierbarkeit und unkomplizierten Analysengang, so wurden die Medizinisch-Technischen Assistentinnen mit der Durchführung vertraut gemacht. Größtenteils konnten die Mikrolitermethoden aus der Methodensammlung zum Mikrolitersystem Eppendorf übernommen werden, teilweise waren Modifikationen nötig, teilweise wurde auf andere bewährte Vorschriften zurückgegriffen (genaue Angaben im Methodenteil). Vielfach war die Erstellung oder Übernahme (67) neuer Normalbereiche (Enzyme: statt Wroblewski-Einheiten : mU/ml) nötig*.

1.3.3.2 Kunststoffmaterial

Gleichzeitig wurden für die Blutentnahme an Stelle der üblichen starkwandigen Glas-Zentrifugenröhrchen spurenfreie Polystyrol-Einmalröhrchen (Durchmesser 21 mm , Höhe 100 mm) mit PVC-Deckel eingeführt. Dadurch entfiel die Verwendung von mit Bichromat-Schwefelsäure gespülten Glasröhrchen für Blut zur Eisen- und Kupferbestimmung. Mit der fast ausschließlichen Verwendung von Einmalgefäßen und Einmalpipettenspitzen wurde die Spülarbeit im Labor ganz wesentlich reduziert, was natürlich Personaleinsparung bedeutet. Nicht zuletzt wurde der Vorgang der Blutannahme, Identifikation und Serumverteilung geändert und neu organisiert (über die Bedeutung des Annahmeplatzes siehe weiter unten). Damit verbunden war die Einführung eines neuen Systems: Laufzettel-Befundübermittlung.

Es ist leicht einzusehen, daß eine so grundlegende Umstrukturierung fast sämtlicher Arbeitsbereiche eines Labors nur Schritt für Schritt und mit Rücksicht auf die

*) An der Erstellung eigener Normalbereiche für die jetzigen Enzymmethoden arbeitet Herr cand.med. P.ZELZER zur Zeit im Rahmen seiner Doktorarbeit.

Arbeitsbelastung des Personals zu bewerkstelligen war. Dies und eine gewisse Anpassung an die finanziellen Möglichkeiten sind der Grund, daß zum Teil Kompromißlösungen eingegangen werden mußten.

1.3.4 Nach Abschluß der Umstellung besteht jetzt die folgende Aufteilung an den Arbeitsplätzen (ohne Annahme und Verteilung):

- I Mikroliter-Einbau-Einheit (Zentrifuge, Thermostat, Rüttler, Pipettenhalterung mit 8 Pipetten) und Photometer Eppendorf. Mikroliter-Absaugküvetten (über Absaugventil zur Wasserstrahlpumpe).
Methoden: Kreatinin (Serum, Urin), Phosphor (Serum, Urin), Harnsäure, Eisen, SPH.
- II Mikroliter-Arbeitsplatz (Thermostat, Rüttler, 8 Pipetten) und Photometer Eppendorf, Mikroliter-absaugküvetten (über Absaugventil zur Wasserstrahlpumpe).
Methoden: Bilirubin direkt und gesamt, Kupfer, Bromsulfophthalein, Erythrozyten-Resistenz und andere seltene Bestimmungen.
- III Mikroliter-Einbaueinheit (wie I), Photometer Eppendorf, 8 Pipetten, temperierbarer Küvettenhalter und Kompensationsschreiber mit Transformationsstufe.
Methoden: LDH, HBDH, GLDH, CPK, CHE und Cholesterin.
- IV Enzymmesplatz (Thermostat für Wechselaufsätze und Haake-Thermostat zur Temperierung der Küvettenhalter, 2 auswechselbare Küvettenhalter, Küvettenwechselautomatik, Kompensationsschreiber mit Transformationsstufe).
Methoden: GOT, GPT, LAP, APH, Amylase, β -Lipoproteide.
- V Technicon-Autoanalyzer.
Methoden: Blutzucker, Harnstoff-Stickstoff.

VI Flammenphotometer (Zeiss PF 5) und Chloridmeter (EEL = Evans Electrode-lenium LTD, Halstead, Essex, England).

Methoden: Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid, Bicarbonat (Handmethode).

VII Elektrophorese-Arbeitsplatz (2 Trennkammern, Netzgerät, Trockenschrank, Zeiss-Auswertgerät mit Integrationsstufe).

Methoden: Elektrophorese im Serum, im Liquor und im Urin.

VIII Coagulation-Unimeter (Fa. Bio Dynamics Inc.), Blutsenkungsgestelle mit 60 Senkungspipetten.

Methoden: Quickwert und Blutsenkung nach WESTER-GREN.

1.3.5 Nach dieser Umstellung, die gewiß von allen Beteiligten viel Arbeit und Geduld erforderte, da die täglichen Routinebefunde laufend weiter geliefert werden mußten, stand erneut das Thema "Qualitätskontrolle" zur Diskussion. Im Gegensatz zu dem Volumen von 56 ml Serum, das man gebraucht hätte, um mit sämtlichen alten Methoden Doppelanalysen auszuführen, sind jetzt noch knapp 5 ml nötig. Damit ist der Gebrauch von käuflichen lyophilisierten Kontrollseren finanziell tragbar geworden.

1.3.5.1 Genau in diese Zeit (15.10. bis 16.12.1969) fiel der II. Ringversuch der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, an der sich das Labor mit der Überprüfung folgender Methoden beteiligte:

In der I. Phase Gesamteiweiß, Glucose, Natrium, Kalium, Calcium, Phosphor, Harnstoff-N, Kreatinin, Serum-Eisen und

in der II. Phase GOT, GPT und LDH. (Ergebnisse siehe bei den einzelnen Methoden.)

Bei der Beurteilung der Ergebnisse muß man berücksichtigen, daß einzelne Arbeitsmethoden erst 2 - 3 Wochen vor-

her in die Routine übergeben worden waren.

1.3.5.2 Durch die guten Erfahrungen mit Kontrollseren der Firma Dade während der Erprobung der Methoden lag es nahe, auch für die Qualitätskontrolle solche zu verwenden. Wir entschlossen uns für die Richtigkeitskontrolle zu Moni-Trol I^R, Lot Nr. LTD 104 A, für die Präzisionskontrolle zu Moni-Trol II X^R, da in den Moni-Trols sämtliche in der Routine bestimmten Substrate und fast alle Enzyme enthalten sind. Für Moni-Trol I wurde ein Jahresvertrag abgeschlossen, der uns den Bezug dieses Kontrollserums mit gleichbleibender Chargennummer für die Dauer eines Jahres garantiert. Moni-Trol II X wurde zunächst in einer für die Dauer eines Vierteljahres ausreichenden Quantität angeschafft.

Täglich wird der Inhalt je eines Fläschchens mit 5 ml bidest. Wasser aus einer Ampulle rekonstituiert. Um die Auflösung möglichst zu standardisieren und Schaumbildung zu vermeiden, baute ich einen kleinen Rotor, in dem die Fläschchen 45 min lang horizontal eingespannt mit einer Geschwindigkeit von 1 U/min ganz langsam um eine horizontale Achse gedreht werden (Radius 4 cm).

1.3.6 Was weiterhin bestand, war das Problem der Erkennung von Fehlern I. und II.Art, das durch chemische Qualitätskontrolle allein nicht zu bewältigen ist. Da das Labor seit April 1970 über einen programmierbaren Tischrechner (Olivetti Programma 102) verfügt, bot sich zur Lösung dieser Frage die Beobachtung des Mittelwertes der Normalwerte eines Analysentages an ("Average of Normals", 147, 82, 83). Dabei gehen wir folgendermaßen vor:

1.3.6.1 Die Arbeitsplatzzettel, die pro Methode Patientennummer und Ergebnis enthalten, werden täglich vom Laborpersonal dem leitenden Assistenten überbracht. Nur für jene Analysenmethoden, deren Tagesquantum die Zahl von 30

bis 40 Untersuchungen überschreitet, errechnet er Mittelwert und Standardabweichung aus denjenigen Ergebnissen, die innerhalb von sehr weiten, aber genau festgelegten Grenzen als normal bezeichnet werden können (siehe unten). Die Ergebnisse werden, nach Methoden aufgeschlüsselt

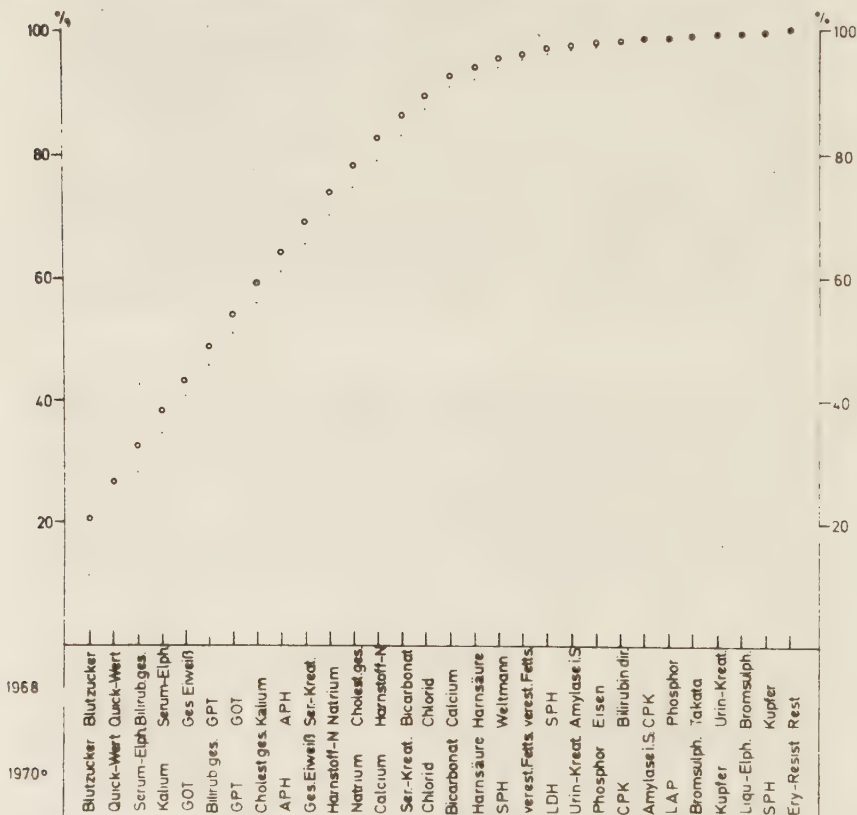


Abb. 7 : Kumulative prozentuale Häufigkeit der einzelnen Analysen einer Stichwoche im Januar 1968 und Januar 1970, geordnet von der häufigsten zur seltensten Bestimmung. Der mit Rest bezeichnete Anteil unter dem Jahr 1968 beinhaltet die Methoden Kupfer, Cholesterin-Ester, SDH und Erythrozyten-Resistenz-Bestimmung. Die Gesamtzahlen der Analysen pro Woche betrugen 1968 2189 und 1970 3424 Bestimmungen. Aus der Kurve ist deutlich zu ersehen, bis zu welcher Grenze eine Automatisierung rentabel wäre. Der Knick in der Kurve zeigt etwa die Grenze zwischen "screening"-Methoden und solchen, die einer speziellen Indikation bedürfen.

selt, mit Datum, Mittelwert, Standardabweichung und Zahl der Einzelwerte täglich in ein Kontrollheft eingetragen. Nach einer Vorperiode von 20 Arbeitstagen (vergleiche Qualitätskontrolle) errechnet man aus den aufgezeichneten Mittelwerten neuerlich Mittelwerte und Standardabweichung. Dieser zweite Rechenvorgang liefert Zentrallinie und Kontrollgrenzen für die nachfolgende Kontrollperiode (siehe Methodenteil): Man zeichnet für jede Methode Mittelwert und 2,6-fache Standardabweichung nach gewohntem Schema (so daß die Kontrollkarte durch die drei Linien in vier gleich große Flächen geteilt wird) in je eine Kontrollkarte ein und vermerkt ab nun mit Klebemarken in der folgenden Kontrollperiode die täglichen Schwankungen des Mittelwertes der Normalwerte (147, 82, 83).

In die gleichen Kontrollkarten werden, nach einem anderen Maßstab (Kontrollgrenzen der Vorperiode), aber in die gleichen graphischen Grenzen, die Analysenergebnisse des Kontrollserums eingetragen (siehe Methodenteil). Dies geschieht durch eine medizinisch-technische Assistentin.

1.3.6.2 Neben einem regellosen Verhalten der beiden Kontrollwerte zueinander kann man folgende Situationen beobachten:

- 1) Der Analysenwert des Kontrollserums folgt in seinen täglichen Schwankungen dem Mittelwert der Normalwerte. Dies spricht für einen täglich unterschiedlich großen systematischen Fehler, beispielsweise beim Pipettieren des Eichstandards, durch dessen Extinktion die Ergebnisse berechnet werden (vergleiche etwa Cholesterin).
- 2) Der Analysenwert des Kontrollserums liegt außerhalb oder nahe der 2,6 s - Grenze, während der Mittelwert der Normalwerte ($\bar{N}$) an der $\bar{x}$ -Linie liegt. Dies deutet auf einen Fehler I.Art (fal-

scher Alarm, Nullhypothese wird fälschlicherweise abgelehnt).

- 3) Im umgekehrten Fall liegt $\bar{N}$ außer Kontrolle, während der Kontrollwert K nahe der Zentrallinie liegt. Dies deutet auf einen Fehler II.Art (Nullhypothese wird fälschlicherweise nicht abgelehnt).
- 4) Beide Werte außer Kontrolle. Hier liegt mit Sicherheit ein systematischer Fehler vor, der schnellstens geklärt und beseitigt werden muß. Die Analysenergebnisse dieser Methode dürfen vorher das Labor nicht verlassen.

1.3.6.3 Voraussetzung für diese Interpretation ist die Tatsache, daß die genannten Mittelwerte der Normalwerte $\bar{N}$ erstaunlich wenig schwanken, selbst bei Methoden wie der Kreatinin-Bestimmung, wo im physiologischen Bereich Konzentrationsunterschiede von einer halben Zehnerpotenz durchaus möglich sind. Für eine weitgehende Konstanz des Patientenkollektivs spricht weiterhin, daß $\bar{N}$ auch bei der Cholesterin-Bestimmung (Normalbereich altersabhängig) nur in engen Grenzen differiert. Die Standardabweichung, errechnet aus 20 Mittelwerten der Vorperiode, ist sogar zahlenmäßig meist kleiner als die aus 20 Tageswerten des Kontrollserums - obwohl diese beiden Werte natürlich keine vergleichbaren Größen darstellen. Ebenso kann man erstere auch nicht etwa zur Erstellung eines Normalbereiches verwenden.

Das Verfahren stellt zweifellos eine Bereicherung und Verfeinerung der Qualitätskontrolle in der Klinischen Chemie dar, da zu der Überwachung durch die Analytikerinnen (Kontrollseren) auch noch die durch den leitenden Assistenten kommt.

Folgende Grenzen wurden für die einzelnen Methoden

als Berechnungsgrundlage festgelegt:

Harnstoff-N	0	bis	25	mg/100 ml Serum
Gesamtbilirubin	0	bis	1,4	mg/100 ml Serum
Kreatinin	0	bis	2,0	mg/100 ml Serum
Cholesterin	150	bis	280	mg/100 ml Serum
Natrium	133	bis	152	mval/l Serum
Kalium	3,3	bis	5,5	mval/l Serum
Calcium	4,2	bis	5,6	mval/l Serum
G O T	0	bis	18,0	mU/ml
G P T	0	bis	18,0	mU/ml
A P H	0	bis	36,0	mU/ml

Weiterhin soll das Verfahren auch noch auf Gesamteiweiß und die einzelnen Elektrophoresefraktionen ausgedehnt werden.

Verständlicherweise sind die zur Berechnung aufgenommenen Werte sorgfältig zu prüfen. So kann es vorkommen, daß an einzelnen Wochentagen die Gesamtzahl der im Labor eingetroffenen Patientenserum gering ist und nur Patienten mit kritischen Werten Blut entnommen wurde. Dadurch kann sich $\bar{N}$ stark dem Grenzbereich nähern. Eine Rücksprache mit den Stationen kann die Plausibilität der Analysenergebnisse klären. Im allgemeinen jedoch liegen zwischen 80 und 90 Prozent aller Ergebnisse des Labors im Normalbereich, was mit dem zunehmenden "diagnostischen screening" mit Hilfe der Klinischen Chemie zusammenhängt.

1.3.7 Auch wenn eine Methode noch in Kontrolle ist, so ist es für die Ärzte am Krankenbett doch wichtig, besonders in Grenzfällen, zu wissen, wo die oben beschriebenen Kontrollwerte an dem betreffenden Tag liegen. Deshalb wurde nach Beendigung der Vorperiode an einer Stelle außerhalb des Labors, an der jeder Arzt zweimal täglich vorübergeht, eine Tafel mit den Kontrollkarten sämtlicher kontrollierter Methoden angebracht. Täglich werden durch eine Assistentin, die nichts mit der Analy-

tik zu tun hat, die Mittelwerte der Doppelanalysen aus dem Präzisionskontrollserum in Form bunter Klebepunkte eingetragen, desgleichen durch den leitenden Assistenten $\bar{N}$, zwar nach einem anderen Maßstab, aber in die gleichen graphischen Grenzen. Durch die Veröffentlichung (der Grenzen) der Leistungsfähigkeit der Methoden (Variationskoeffizient) und der Größe des jeweiligen Fehlers (Abweichung von der Zentrallinie) kann viel zu einem besseren Verständnis von Laborwerten beigetragen werden.

METHODEN, ERGEBNISSE
UND SPEZIELLE DISKUSSION

2.1 Organisation der Blutannahme und Serumverteilung

Dem eigentlichen Methoden- und Ergebnisteil sei eine kurze Betrachtung der Bedeutung und Probleme des Annahmeplatzes vorangestellt.

Leider hat man sich hier mit der Tatsache abzufinden, daß das Patientenblut im Hinblick auf eine rationelle Arbeitsweise im Labor zu spät eintrifft (siehe unten). Aus klinikinternen Gründen wurde der letztmögliche Abgabetermin für Blut, das noch am gleichen Tag die Analytik durchlaufen soll (ausgenommen natürlich Notfälle), auf 9.30 Uhr festgesetzt. Deshalb muß die Serumverteilung an die einzelnen Arbeitsplätze schnell und reibungslos erfolgen, um nicht noch mehr Zeit zu verlieren.

Es bestand weiterhin die Schwierigkeit, daß das im Labor angekommene Blut infolge Verwendung von Kunststoffröhrchen zum Teil noch nicht geronnen war (die mikroskopisch rauhere Glasoberfläche aktiviert den Gerinnungsvorgang). Eine wesentliche Verbesserung konnte einmal dadurch erzielt werden, daß die Röhrchen mit 2 bis 3 ml Polystyrolgranulat (Asal-Z^R) gefüllt (verschlossen) vom Labor ausgegeben werden. Sind die Röhrchen mit Blut gefüllt und wieder verschlossen, werden sie vorsichtig umgestürzt, damit sich das Granulat mit dem Blut mischt. Dadurch erreicht man in etwa 50 % der Fälle eine beschleunigte Blutgerinnung. Gleichzeitig setzt sich das Granulat, dessen spezifisches Gewicht zwischen dem der Erythrozyten und dem des Serums liegt, beim Zentrifugieren zwischen Blutkuchen und Serum ab, was ein erythrozytenfreies Abgießen des Serums ermöglicht. Zum anderen werden die Blutröhrchen, sowie sie im Labor eintreffen, genau 15 min in ein 37° C warmes Wasserbad gestellt. Hierdurch erreicht man eine Aktivierung der Gerinnung in zusätzlich etwa 20 %. Der Rest, etwa 10 % der gesamten Tagesmenge, muß nach dem ersten Zentrifugieren noch einmal nachzentrifugiert werden.

Während die Röhrchen im Wasserbad stehen, werden sie und die zugehörigen Laufzettel mit Tagesnummern versehen.

Wie angedeutet, wird das Serum nach dem Zentrifugieren in ein zweites, kleineres Polystyrolröhrchen umgegossen, das die entsprechende Tagesnummer trägt*. Dieses wandert zusammen mit dem Laufzettel zum Verteilerplatz, dessen Kernstück die Verteilerbrettchen sind - kleine kunststoffbeschichtete Holzbrettchen vom Format 15 x 40 cm. Sie enthalten sechs waagrechte Reihen von je achtzehn Löchern. Dabei entspricht eine waagrechte Lochreihe einer Serum-Tagesnummer, eine senkrechte Lochreihe ein bis drei Analysenmethoden. Eine Assistentin versieht nun an Hand des Laufzettels Mikrolitergefäße (ohne Deckel) mit Tagesnummer und einem kurzen Symbol pro gewünschter Analyse (bis zu drei Analysen pro Gefäß) und setzt das Gefäß in das entsprechende Loch des Verteilerbrettchens. Hat sie so sechs Laufzettel durchgearbeitet, so kommen diese zusammen mit dem Brett zu einer zweiten Assistentin, die, unter nochmaliger Kontrolle des Laufzettels, die Mikrolitergefäße einer waagrechten Reihe mit dem zugehörigen Serum füllt. Sie kann dabei auf einen Blick abschätzen, was alles verlangt ist und wieviel Serum ihr zur Verfügung steht. Sind die Mikrolitergefäße mehrerer Verteilerbrettchen mit Serum gefüllt, so werden die Gefäße entsprechend den senkrechten Lochreihen der Reihe nach von der niedrigsten zur höchsten Tagesnummer auf Eppendorf-Reaktionsgefäßhalter übertragen . Diese wandern an die einzelnen Arbeitsplätze; sie enthalten jetzt nur noch Gefäße mit Seren, die den gleichen Analysengang durchlaufen sollen (bzw. für zwei oder drei Analysen, die an einem Arbeitsplatz durchgeführt werden. So

*) Dieses Röhrchen wird mit dem von der Analytik übriggebliebenen Serum bis zum nächsten Tag bei + 4° C im Kühlhaus aufbewahrt, um die Plausibilität etwa von der Station angezweifelter Werte durch eine nochmalige Analyse prüfen zu können.

bedeutet z.B. die Beschriftung " 31 Tr a ", daß es sich um Serum der Tagesnummer 31 handelt, aus dem die Aktivität der Transaminasen und der alkalischen Phosphatase zu ermitteln ist.).

Obwohl sich dieses System gut bewährt hat und von allen ausprobierten das schnellste ist, dauert es doch, je nach Zahl der Tagesnummern, bis 11.00 oder 11.30 Uhr, bis alles Serum an die Arbeitsplätze verteilt ist, was bedeutet, daß zum Teil erst ab diesem Zeitpunkt mit größeren Serien, das heißt rationell, gearbeitet werden kann.

Inzwischen bietet die Industrie des In- und Auslandes verschiedenste automatische Serumverteiler-Anlagen mit gleichzeitiger positiver Probeidentifikation an. Leider haben diese noch entscheidende Nachteile und sind noch nicht über das Stadium des Experimentes hinausgekommen. Abgesehen von den hohen Kosten und der Tatsache, daß sie nur bei sehr großen Serien voll ausgelastet werden können, sind sie zum Teil zu wenig flexibel und in der Tat im Augenblick noch nicht schneller als eine Verteilung von Hand.

Der Laufzettel (Abb. 8) selbst besteht aus dem Original, zwei Durchschlägen und zwei dazwischenliegenden Kohlepapieren. Das Schriftfeld, das Angaben über Patient und Station enthält, wird maschinell nach dem "Adressograph"-System beschriftet. Die Analysenmethoden sind in zwei Rubriken aufgeführt: rechts die sogenannten "screening"-Methoden, d.h. diejenigen, die bei jedem Patienten grundsätzlich durchgeführt werden, links jene Analysen, die einer speziellen Fragestellung bedürfen. Die Ergebnisse werden auf das Originalblatt eingetragen (sie werden auf den Stationen abgetrennt und mittels Gummierung in die Krankenblätter eingeklebt), der erste Durchschlag bleibt im Labor, der zweite ist für die Abrechnungsstelle bestimmt. Damit wird ein zu häufiges Übertragen von Zahlen, dem zwangsläufig große Fehlermöglichkeiten anhaften, mög-

lichst vermieden.

LABORATORIEN FÜR KLINISCHE CHEMIE
DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK (Lab. 184/8, Tel. 336)

Serumchemie

Name

S. № 4392

Kosten-
träger:

Name

Nr.:

S. № 4392

Vorname

geb.

Tages-Nr.:

anford.
Stelle

Klinik

Stat.

Datum

Bemerkungen:

SPH	mU/ml	Saure Phosphatase	Harnstoff-N	HS-N	mg%
Amyl.	mU/ml	Amylase	Serum-Kreatinin	Kreat.	mg%
LDH	mU/ml	Lactatdehydrogenase	Kreatinin für Kreat.- Clearance		
HBDH	mU/ml	α -Hydroxybutyrat DH	Harnsäure	Harnsäure	mg%
LAP	mU/ml	Leucinaminopeptidase	Cholesterin ges.	Chol.	mg%
CPK	mU/ml	Creatinphosphokinase	Bilirubin ges.	Bil. ges.	mg%
GLDH	mU/ml	Glutamatdehydrogenase	Bilirubin dir.	Bil. dir.	mg%
CHE	mU/ml	Cholinesterase	GOT	GOT	mU/ml
Gs. Lip.	mg%	Gesamtlipide	GPT	GPT	mU/ml
BST E ₂		Bromsulphthaleintest	alkal. Phosphatase	APH	mU/ml
	g%		Natrium	Na+	mval/l
Fe	μ g%	Serumeisen	Kalium	K+	mval/l
GEBK	μ g%	Eisenbindungskapazität	Kalzium	Ca++	mval/l
UEBK	μ g%		Gesamteiweiß	Gs. Eiw.	g%
Cu	μ g%	Serumkupfer	Elektrophorese:	El' pho.	
Cl-	mval/l	Chlorid	Präalbumine	Prä-Alb.	%
HCO ₃ -	mval/l	Bicarbonat	Albumine	Alb.	%
P	mg%	Phosphor	Globuline α_1		%
		Phosphor für P-Clearance	α_2	α_2	%
		Spezialmethoden:	β	β	%
			γ	γ	%

Abb. 8 : Laufzettel des klinisch-chemischen
Routinelaboratoriums der II. Medizinischen
Universitätsklinik München.

2.2 Traktat über den Umgang mit Mikroliterpipetten

"Marburg"

Unter allen Geräten des "Eppendorf-Mikrolitersystems" bereitet die Handhabung und Pflege der Pipetten erfahrungsgemäß die größten Schwierigkeiten. Deshalb sei es gestattet, kurz auf die besondere Problematik einzugehen.

Leider besteht die Tatsache, daß bislang keine Assistentin von der Ausbildung her irgendwelche Kenntnisse oder Erfahrungen mit Mikroliterpipetten mitbringt, so daß sie darauf angewiesen ist, sich in Kürze damit vertraut zu machen, um die Vorzüge dieses Gerätes in Handhabung und Genauigkeit voll ausnützen zu können. Dazu gehört, daß ihr möglichst oft und eindringlich folgende Punkte dargelegt werden:

2.2.1 Richtige Haltung der Pipette.

Der Daumen und nicht der Zeigefinger soll den Druckknopf bedienen. Beim Entleeren soll zwischen Gefäßwand und Pipettenspitze ein Winkel von etwa 15° bestehen!

2.2.2 Langsam pipettieren!

Dies ist der Kernpunkt, der nicht oft genug eindringlich betont werden kann. Die Zeit für Füllen und Entleeren der Pipettenspitze ist sehr von der Viskosität der Flüssigkeit abhängig. Zwischen Hub und Überhub ist beim Entleeren eine deutliche Pause einzuhalten, um der nachlaufenden Flüssigkeit Zeit zu geben, sich in der Pipettenspitze zu sammeln.

2.2.3 Man vermeide strengstens, daß durch ungeschicktes Handhaben, zu schnelles Pipettieren oder Hinlegen der gefüllten Pipette Flüssigkeit in den Kapillarschlauch

bzw. in den Arbeitskolben der Pipette gerät. Das Dichtungsfett neigt dabei zum Verharzen, die Pipette verklebt und wird undicht. Man öffne die Pipette und reinige sie gründlich. Das sollte man auch tun, nachdem man Flüssigkeiten pipettiert hat, die aggressive Dämpfe entwickeln (Schwefelsäure, Essigsäure etc.).

2.2.4 Werden Flüssigkeiten pipettiert, die das Material der Pipettenspitze (PVC) benetzen (Schwefelsäure, Serum), so ist die Spitze einmal mit dem Pipettiergut vorzuspülen, um den Volumenfehler durch die anhaftende Flüssigkeit zu kompensieren.

2.2.5 Nach jedem Pipettiervorgang, vor allem beim Arbeiten mit benetzenden Flüssigkeiten, sollte die Pipettenspitze, während der Daumen den Bedienungsknopf noch in Überhubstellung hält, gründlich mit einem nichtfasernden Zellstoffläppchen abgewischt werden. Vor allem beim Pipettieren von Serum vermeidet man durch Berühren der Pipettenspitzenöffnung mit dem Zellstoff Blasenbildung und damit größere Verschleppungsfehler.

2.2.6 Zerlegen und Reinigen der Pipette:

Die Pipetten, die einen Glaszylinder enthalten, sollten täglich (!) nach Gebrauch geöffnet, gereinigt und neu (sparsam) gefettet werden. Durchgängigkeit des Kapillarschlauches im Arbeitskolben und Zustand der Dichtungsringe ist zu überprüfen (sie quellen nach längerem Gebrauch und verlieren an Elastizität). Die Größen 5 - 100 μ l, die ein anderes Dichtungspaket enthalten, sind nicht so verschleißanfällig und sind nur auf Dichtigkeit zu prüfen (s.u.). Die richtige Reihenfolge der Einzelteile beim Zusammenbauen der Pipetten ist natürlich entscheidend für die Funktionsfähigkeit; hier ist mit Sorgfalt zu üben. Um Aufbau, Pflege und Prinzip der Pipetten möglichst anschaulich zu demonstrieren, stellte ich zusammen mit den Assistentinnen des Labors einen etwa 20

Minuten dauernden Schmalfilm her, der in Großaufnahmen alle entscheidenden Einzelheiten demonstriert. Dieser Film wird in regelmäßigen Zeitabständen vorgeführt.

2.2.7 Prüfen der Pipette. Hier gibt es im wesentlichen drei Möglichkeiten:

2.2.7.1 Auswiegen des entleerten Spitzeninhaltes (z.B. dest. Wasser) mit einer Mikrowaage.

2.2.7.2 Erstellen einer Verdünnungsreihe mit dem ganzen Pipettensatz aus einer Stamm-Farbstofflösung und Vergleich mit den Extinktionen einer Verdünnungsreihe, die parallel dazu mit amtlich geeichten Glasgeräten gewonnen wurde.

2.2.7.3 Dichtigkeitsprüfung mit einer der Pipettenspitze anhängenden Wassersäule in einem etwa 120 cm langen Schlauch.

Von diesen drei Möglichkeiten ist für die tägliche Routine in einem großen Labor mit 40 bis 50 Pipetten zweifellos die letztgenannte am ehesten praktikabel. Da der Pipettenhub mit optimaler Genauigkeit vom Hersteller mit Endmaßen einjustiert ist, kann ein eventueller Volumenfehler nur auf einen verlegten Kapillarschlauch oder auf Undichtigkeiten zurückzuführen sein. Gerade hier kann aber bei mehrmaliger Betätigung des Hubknopfes durch Addition der Einzelfehler mit dem letztgenannten Prüfverfahren bereits ein winziges Volumendefizit aufgespürt werden, vor allem weil die Pipette in allen Funktionszuständen auf Dichtigkeit überprüft wird. Es genügt also, sich einmal beim Erwerb der Pipette durch eine der Möglichkeiten 2.2.7.1 oder 2 von der absoluten Genauigkeit der Pipette zu überzeugen (und dann eventuell in großen Zeitabständen). Entspricht das Hubvolumen einer Pipette einmal tatsächlich nicht dem Sollvolumen, so ist sie zum Herstellerwerk einzusenden. Eine Möglichkeit, die Pipette selbst zu justieren, besteht nicht.

2.3 Methoden, die im Milliliterverfahren und im Mikro-
literverfahren kontrolliert wurden

2.3.1 Die Kreatininbestimmung in Serum und Urin

2.3.1.1 Kreatinin-Milliliterverfahren

2.3.1.1.1 Prinzip:

Das Serum wird nach NEUBAUER mit Uranylacetat enteiweißt. Mit dem Filtrat stellt man die JAFFÉ-Reaktion an.

2.3.1.1.2 Ungefähres Reaktionsschema: (nach SEELIG, 141)

Der JAFFÉ-Reaktion liegen außerordentlich komplizierte chemische Vorgänge zugrunde, die noch weitgehend ungeklärt sind. Der Reaktionsablauf wird besonders durch das Ineinandergreifen verschiedener Gleichgewichtsvorgänge und durch die relative Instabilität des roten Reaktionsproduktes unübersichtlich. Fest steht, daß das Reaktionsprodukt nicht, wie früher angenommen, Pikraminsäure ist. Es handelt sich vielmehr um einen Komplex aus Pikrinsäure und Kreatinin, das keine reine kovalente Bindung besitzt und nur in alkoholischen Lösungen stabil ist.

"Die JAFFÉ-Reaktion stellt nach allen bisher erhobenen Befunden eine Gleichgewichtsreaktion dar, die formal durch



dargestellt werden kann."

Kompliziert wird der Vorgang durch die Tatsache, daß bei höheren Kreatininkonzentrationen zunehmend Komplexe aus einem Pikrinsäuremolekül und zwei Molekülen Kreatinin entstehen, die in alkalischer Lösung keine Rotfärbung aufweisen. Diese Tatsache ist der Grund dafür, daß die Kreatinin-Eichkurve nur bis 8, höchstens bis 10 mg pro

100 ml linear 1st.

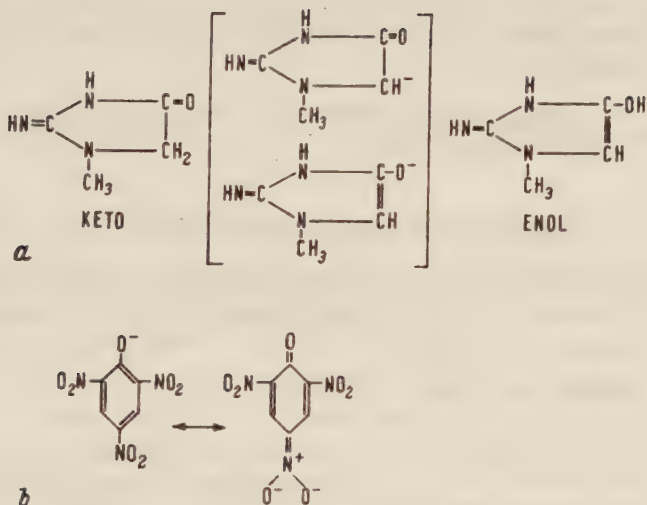


Abb. 9 : a) Keto-Enol-Tautomerie des Kreatinins als Gleichgewicht zwischen zwei Säuren und ihrem gemeinsamen Anion.
b) Zwei mesomere Grenzstrukturen des Pikrat-ions (nach SEELIG, 141).

2.3.1.1.3 Reagenzien:

- 1) Pikrinsäurelösung 1,2 %ig (Merck p.a.604)
- 2) Natriumhydroxid, Plättchenform (Merck p.a. 6496)
- 3) Uranylacetat (Merck p.a. 9425)
- 4) Kreatinin (Merck p.a. 5208)
- 5) 1 N Salzsäure

2.3.1.1.4 Herstellung der Lösungen:

- 1) Die 1,2 %ige Pikrinsäurelösung wird einige Tage bei 37° C im Brutschrank aufbewahrt und erst bei Bedarf nach Abkühlen in die Gebrauchsflasche filtriert.

- 2) 1 N Natronlauge: 8 g NaOH werden mit dest. Wasser auf 200 ml aufgefüllt.
- 3) 2,5 N Natronlauge: 100 g NaOH werden in 800 ml dest. Wasser gelöst und nach Erkalten auf 1000 ml aufgefüllt.
- 4) 16 g Uranylacetat werden mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

2.3.1.1.5.1 Arbeitsweise Serumkreatinin:

- 1) Geräte: a) graduiertes Reagenzglas, b) 2 ml Vollpipette, c) 10 ml Stabpipette, d) 5 ml Stabpipette.
- 2) Pipettierschema:

	Analyse	Blindprobe	Geräte
Serum	2,0 ml	-	a
dest. Wasser	6,0 ml	-	a
Uranylacetatlösung	2,0 ml	-	a
nacheinander in Erlenmeyerkolben gießen, mischen und durch einen Faltenfilter in einen zweiten Kolben filtrieren.			
Filtrat	2,0 ml	-	b
dest. Wasser	-, -	2,0 ml	b
Pikrinsäurelösung	1,5 ml	1,5 ml	c
Natronlauge 1 N	0,5 ml	0,5 ml	d
schütteln und 10 min bei Zimmertemperatur stehen lassen. Extinktionsmessung mit Photometer Eppendorf bei Filter 546 nm in einer 10 mm-Küvette. Nullpunkteinstellung auf die Blindprobe.			

2.3.1.1.5.2 Berechnung:

Die Konzentration des Kreatinin im Serum erhält man nach einer Eichkurve, nach der in unserem Fall 1 mg Kreatinin in 100 ml Serum einer Extinktion von 0,176 entsprach.

Normalwerte: 0,6 - 1,4 mg Kreatinin/100 ml Serum.

2.3.1.1.5.3 Eichung:

- 1) Kreatininstammlösung: 100 mg Kreatinin werden in 100 ml N-Salzsäure gelöst. 10 ml davon werden mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.
- 2) Aus der Stammlösung (10 mg/100 ml Serum) stellt man sich eine Verdünnungsreihe von 2, 4, 6 und 8 mg Kreatinin pro 100 ml her und führt damit den oben beschriebenen Analysengang durch. Durch Eintragung der gefundenen Extinktionen in ein Koordinatensystem gegen die Konzentration erhält man eine Eichgerade, die durch den Nullpunkt gehen muß.

2.3.1.1.6.1 Arbeitsweise Urinkreatinin:

- 1) Geräte: a) 1 ml Stabpipette, b) 2 ml Vollpipette, c) 5 ml Stabpipette.
- 2) Pipettierschema:
Man pipettiert in einen 100 ml Meßkolben:

	Analyse	Geräte
Urin	0,5 ml	a
1,2 %ige Pikrinsäurelösung	2,0 ml	b
2,5 N Natronlauge	1,5 ml	c

Man schüttelt und läßt anschließend 10 min stehen. Dann wird mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt. In einer 20 mm-Küvette mißt man die Extinktion mit dem Photometer Eppendorf bei Filter 546 nm.

2.3.1.1.6.2 Berechnung:

Die Auswertung erfolgt nach einer Eichkurve (vergleiche Serumkreatinin).

Normalbereich: 1,1 - 2,5 mg/kg/24 h Männer (67)
0,01 - 1,33 mg/kg/24 h Frauen,
stark nahrungsabhängig.

2.3.1.1.7 Hinweis:

"Die Reaktion ist nicht spezifisch und kann durch Anwesenheit reduzierender Substanzen gestört werden. Im Serum treten jedoch bis 300 mg% Glucose, 100 mg% Fructose, 10 mg% Vitamin C, 10 mg% Aceton und 5 mg% Acetacetat, im Harn bis zu 5 % Glucose, 5 % Fructose, 5 % 3-hydroxybuttersäure, 2 % Vitamin C, 1,5 % Aceton und 0,2 % Acetessigsäure keine Störungen auf.

Durch kurzes Aufkochen des Harnes kann Eiweiß ausgefällt und durch Filtration entfernt werden. Acetessigsäure wird hierbei zersetzt, während sich Aceton und Schwefelwasserstoff verflüchtigen." (11) -

2.3.1.2 Kreatinin-Mikroliterverfahren*

2.3.1.2.1 Prinzip:

Nach der Enteiweißung des Serums mit Trichloressigsäure wird im Überstand die JAFFÉ'sche Reaktion ausgeführt (siehe Milliliterverfahren 2.3.1.1.1). Kreatinin gibt dabei einen orange-roten Farbkomplex, dessen Extinktion in 20 mm-Küvetten mit Filter Hg 546 nm gemessen wird. Die Reaktion ist jedoch nicht streng spezifisch für

* Modifiziert nach Eppendorf-Firmendruckschrift für Mikroliterverfahren.

Kreatinin. Reaktionsschema siehe 2.3.1.1.2 .

2.3.1.2.2 Reagenzien:

1. Pikrinsäurelösung 1,2 %ig (Merck p.a. 604)
2. Natriumhydroxid reinst Plätzchenform p.a.
(Merck 6496)
3. Trichloressigsäure 3 M (etwa 40 %ig) p.a.
(Merck 811)
4. Kreatinin p.a. (Merck 5208)

2.3.1.2.3 Herstellung der Lösungen:

1. Natronlauge 5 %ig
5 g Natriumhydroxid p.a. in Wasser lösen und auf 100 ml mit dest. Wasser auffüllen.
2. Trichloressigsäurelösung 7 %ig
17,5 ml Trichloressigsäure 3 M (etwa 40 %ig) werden mit 82,5 ml dest. Wasser verdünnt.
3. Kreatininstandard 2,0 mg/100 ml
Durch Auflösen von 100,0 mg Kreatinin in 100 ml 1 N Salzsäure stellt man sich eine Kreatinin-Stammlösung (100 mg/100 ml) her. Davon werden 2,0 ml mit dest. Wasser auf 100 ml verdünnt. Diese Lösung weist einen Gehalt von 2,0 mg Kreatinin/100 ml auf.

2.3.1.2.4.1 Arbeitsweise:

In Reaktionsgefäße pipettiert man:

	Analyse	Blindprobe (dreifach)
Serum	200/ul	---
dest. Wasser	---	200/ul
Trichloressigsäure	500/ul	500/ul

Jedes Gefäß wird sofort verschlossen, einmal umgeschüttelt, auf den laufenden Rotationsmischer gesetzt, 1 min. gerüttelt und anschließend 1,5 min. zentrifugiert.

Danach pipettiert man in neue Reaktionsgefäße:

Überstand	200/ul	200/ul
Pikrinsäure	100/ul	100/ul
Natronlauge	100/ul	100/ul

30 sec. mischen. 15 min nach Zugabe der Natronlauge werden die 400/ul in die 20 mm-Absaug-Mikroküvette überführt und bei 546 nm die Extinktion gemessen, nachdem man den Nullpunkt mit der Blindprobe eingestellt hat. Für jede Serie werden vorteilhaft drei Blindwerte angesetzt (Anmerkg. 2).

2.3.1.2.4.2 Berechnung:

$$E_{\text{Serum}} \times 20 = \text{mg Kreatinin}/100 \text{ ml Serum.}$$

Normalwerte: 0,06 - 1,82 mg Kreatinin/100 ml Serum
(67).

Eichung: Verdünnungsreihe siehe Milliliterverfahren.

2.3.1.2.5 Bestimmung im Urin:

An Stelle des Serums setzt man 200/ul einer Urinverdünnung aus 20/ul Urin und 1000/ul dest. Wasser in den obigen Analysengang ein. Multipliziert man die gemessene Extinktion mit 1020, so erhält man nach obiger Formel mg Kreatinin/100 ml Urin.

2.3.1.2.6 Kreatininclearance:

Mit Hilfe des sogenannten Clearanceverfahrens läßt sich indirekt das von allen Nierenglomeruli zusammen pro Minute filtrierte Primärharnvolumen bestimmen. Hierbei bedient man sich entweder einer von außen durch Dauerinfusion zugeführten Substanz (z.B. Inulin) oder des endogenen Kreatinins, dessen Konzentration im Serum sehr konstant gehalten wird. Die Genauigkeit der endogenen Kreatininclearance ist derjenigen des Inulins unterlegen (Kreatinin wird bei Serumkonzentrationen über 2 mg% nicht nur filtriert, sondern auch meßbar sezerniert, so daß im Stadium der Niereninsuffizienz die Kreatininclearance höher sein kann als das tatsächliche Filtrat), reicht aber für klinische Belange meistens aus (145). Zur Clearance-Berechnung eignet sich die Formel:

$$C = \frac{U}{P} \cdot \dot{V}_u$$

Dabei bedeuten: U Kreatininkonzentration im Urin (mg%)
P Kreatininkonzentration im Serum (mg%)
 $\dot{V}_u$ Harnvolumen pro Minute (ml/min)

Die Clearanceformel gibt dasjenige Serumvolumen an, das pro Minute von Kreatinin befreit ("geklärt") wird.

2.3.1.2.7 Anmerkungen: Siehe auch "Hinweise" bei Milliliterverfahren (2.3.1.1.7).

1. Zur Kontrolle der Reagenzien und der Arbeitsbedingungen sollte stets eine Standardlösung oder noch besser ein Standardserum mit angesetzt werden (s. Qualitätskontrolle 2.3.1.3).
2. Nur bei Verwendung reinster Pikrinsäure kann der angegebene Faktor benutzt werden. Die Extinktion der Blindprobe sollte $E = 0,03$ (gemessen gegen dest. Wasser) nicht wesentlich überschreiten. Der vorliegende Faktor wurde mit Standardlösungen und Standardseren ermittelt.

3. Keinesfalls sollte die Kreatinintagesausscheidung im Urin heute noch als Maß für die Vollständigkeit der Sammlung des 24-h-Urins verwendet werden, schon gar nicht sollte man danach irgendwelche Konzentrationen anderer Harnbestandteile korrigieren (37).
4. Eine exakte Bestimmung des Serumkreatininspiegels ist von großer klinischer Bedeutung. Bei beginnender Niereninsuffizienz steigt die Kreatininkonzentration im Serum etwa doppelt so rasch an wie die des Harnstoff-Stickstoffes (132).

2.3.1.2.8 Literatur:

6, 11, 34, 40, 59, 62, 73, 75, 93, 97, 104, 116, 122, 133.

2.3.1.3 Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Kreatininbestimmung

2.3.1.3.1 Präzisionskontrolle Milliliterverfahren

	$\bar{x}$	s	VK%
Lab-Trol 1968, T. T., (verschiedene Chargen)	1,02-1,13	0,07-0,14	7-14
1. Ringversuch, T. T.			
1. Ergebnis	1,09	0,08	7,3
2. Ergebnis	1,07	0,06	5,6
Schweineserum, T. T.	1,62	0,22	13,6
"patholog." Schweineserum, T. T.	15,5	1,10	7,0

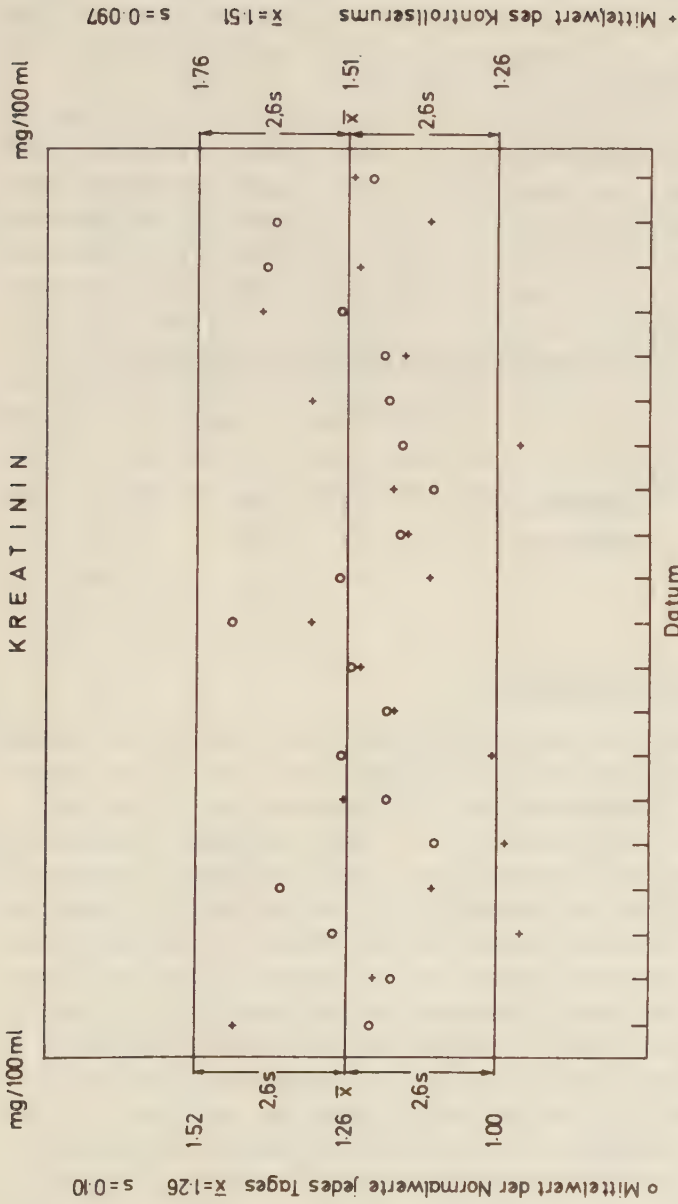


Abb. 10 : Qualitätskontrollkarte für Kreatinin im Serum vom 1. 7. bis 27. 7.1970. Kontrollserum Moni-Trol I.

2.3.1.3.2 Präzisionskontrolle Mikroliterverfahren

	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.			
1. Ergebnis	2,27	0,18	7,9
2. Ergebnis	2,38	0,23	9,6
Moni-Trol I , Serie	1,54	0,038	2,5
Moni-Trol II X, Serie	2,75	0,054	1,9
Moni-Trol II X, T. T.	2,96	0,124	4,2

2.3.1.3.3 Richtigkeitskontrolle Mikroliterverfahren

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch,				
1. Ergebnis, T. T.	1,72	1,69	0,13	7,7
2. Ergebnis, T. T.	1,72	1,80	0,13	7,2
Moni-Trol I	1,2	1,51	0,097	6,4

2.3.1.3.4 Bemerkungen:

Obwohl die Präzision in der Serie bei der Bestimmung des Serum-Kreatinins als befriedigend gelten kann, liegt der Variationskoeffizient der Präzision von Tag zu Tag doch fast einheitlich bei 7 %. Eine geringere Streuung war mit keiner der gebräuchlichen Modifikationen zu erzielen, da die größte Fehlerquelle, die Enteiweißung, nirgends zu umgehen ist. Die Richtigkeit der Methode kann als ausreichend bezeichnet werden, wie die Kontrolle aus dem 2. Ringversuch mit einem flüssigen Kontrollserum zeigt (hier wurde aus 1. und 2. Ergebnis der täglichen Doppelwerte getrennt $\bar{x}$ und s errechnet). Die erstaunlich hohe Abweichung des Mittelwertes vom Sollwert bei Moni-Trol I liegt an einer Trübung, die dieses gefriergetrocknete und rekonstituierte Kontrollserum mit Pikrinsäure ergibt und die durch Zentrifugieren nicht beseitigt wird. Mögli-

cherweise liegt das an einem Denaturierungsprozeß, den die Serumeiweißkörper beim Lyophilisieren erfahren (persönliche Mitteilung der Firma Asid, Lohhof bei München).

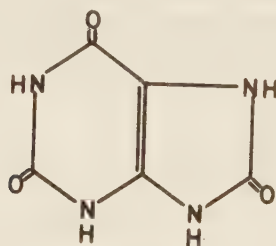
Da die Grenzen des Normalbereiches fast eine Zehnerpotenz voneinander entfernt sind, streuen die Mittelwerte der Normalwerte relativ weit. Ein Zusammenhang in der täglichen Abweichung von der Zentrallinie mit der Präzisionskontrolle läßt sich nicht zeigen, die Ergebnisse scheinen statistisch zu streuen (siehe Abb. 10), was gegen das Vorliegen eines systematischen Fehlers spricht. Die Ergebnisse des Kontrollserums zeigen viermal " Alarm ", während $\bar{N}$ jedesmal weit im Normalbereich liegt. Hier mußte im Einzelfall der Grund des Fehlers geklärt werden. Neben einer strengen Überwachung der Reinheit der Pikrinsäure ist hier möglicherweise die Verwendung eines flüssigen Kontrollserums (z.B. Lab-Trol, Dade) zu empfehlen.

2.3.2 Bestimmung der Harnsäure im Serum

2.3.2.1 Harnsäure-Milliliterverfahren

2.3.2.1.1 Prinzip:

Das Serum wird nach NEUBAUER durch Uranylacetat enteiweißt und das Filtrat mit Natriumcarbonatlösung alkalisiert. Im alkalischen Medium wird Phosphorwolframsäure durch Harnsäure zu chemisch unterschiedlichen blauen Farbkomplexen reduziert, deren Extinktion bei 573 nm gemessen wird. Die Reaktion ist zwar unspezifisch, aber sehr empfindlich und für klinische Zwecke geeignet.



Harnsäure

2.3.2.1.2 Reagenzien:

- | | |
|----------------------|---------------------|
| 1) Natriumcarbonat | (Merck p.a. 6392) |
| 2) Natriumwolframat | (Merck p.a. 6637) |
| 3) Phosphorsäure | (Merck p.a. 573) |
| 4) Brom | (Merck p.a. 1948) |
| 5) Uranylacetat | (Merck p.a. 9425) |
| 6) Harnsäure | (Merck 814) |
| 7) Schwefelsäure 2 N | |
| 8) Lithiumcarbonat | (Merck 5671) |
| 9) Formaldehydlösung | (Merck 4003) |

2.3.2.1.3 Herstellung der Lösungen:

- 1) Natriumcarbonatlösung, gesättigt, ca. 22 %ig:
Na₂ CO₃ im Überschuß in dest. Wasser einbringen, schütteln und filtrieren. Die Lösung ist unbegrenzt haltbar.
- 2) FOLIN'sches Reagens: (Harnsäurereagens nach FOLIN und DENIS). 20 g Natriumwolframat und 16 ml 85 %ige Phosphorsäure werden in 200 ml dest. Wasser gelöst und zwei Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die Lösung wird grünlich-blau. Man gibt 3 - 4 Tropfen Brom zur Entfärbung zu und kocht einmal auf, um das Brom wieder zu entfernen. Unbegrenzt haltbar.
- 3) Uranylacetatlösung, 1,6 %ig: 16 g Uranylacetat werden in 1 l dest. Wasser gelöst. Unbegrenzt haltbar.

2.3.2.1.4 Arbeitsweise

- 2.3.2.1.4.1 Geräte:
- a) graduiertes Reagenzglas
 - b) 4 ml Vollpipette
 - c) 2 ml Stabpipette
 - d) 1 ml Stabpipette

2.3.2.1.4.2 Pipettierschema:

	Analyse	Geräte
Serum	2,0 ml	a
dest. Wasser	6,0 ml	
Uranylacetatlösung	2,0 ml	

nacheinander in Erlenmeyerkolben gießen und durch einen Faltenfilter in einen zweiten Kolben filtrieren.

	Analyse	Geräte
Filtrat	4,0 ml	b
Natriumcarbonatlösung	1,8 ml	c
FOLIN'sches Reagens	0,2 ml	d

schütteln und 5 min bei Zimmertemperatur stehen lassen. Extinktionsmessung mit Photometer Eppendorf durch Filter 573 nm in einer 10 mm-Küvette. Nullpunkteinstellung auf dest. Wasser.

2.3.2.1.5 Berechnung:

Die Konzentration der Harnsäure im Serum erhält man nach einer Eichkurve, nach der in unserem Fall 10 mg Harnsäure in 100 ml Serum einer Extinktion von 0,540 entsprachen.

Normalwerte: 1,5 - 4,5 mg Harnsäure/100 ml Serum.

2.3.2.1.6 Eichung:

- 1) Harnsäure-Stammlösung (100 mg/100 ml):
500 mg Harnsäure werden auf dem Magnetrührer in 75 ml 0,4 %iger Lithiumcarbonatlösung gelöst. Dann werden 20 ml Formaldehydlösung zugesetzt und auf ca. 250 ml mit dest. Wasser verdünnt. Nach Zusatz von 6,25 ml 2 N-Schwefelsäure füllt man mit dest. Wasser auf 500 ml auf. Diese Lösung ist bei + 4° C etwa 4 Wochen haltbar.
- 2) Aus der Stammlösung stellt man sich durch Verdünnen Konzentrationen von 2, 4, 6, 8 und 10 mg Harnsäure pro 100 ml her und führt den beschriebenen Analysengang durch. Durch Eintragung der erhaltenen Extinktionen in ein geeignetes Koordinatensystem erhält man eine Eichgerade, die

durch den Nullpunkt gehen muß.

Literatur: siehe Mikroliterverfahren.

2.3.2.2 Harnsäure-Mikroliterverfahren*

2.3.2.2.1 Prinzip:

Nach Enteiweißung des Serums mit Wolframsäure wird die Phosphorwolframsäure in alkalischer Lösung durch Harnsäure zu einem blauen Farbkomplex reduziert, dessen Extinktion bei 578 nm gemessen wird. Die Alkalisierung erfolgt mit einem Gemisch aus Natriumsilikat und Glycerin, wodurch eine hohe Konstanz der Färbung erzielt wird. Die Blaufärbung ist nicht streng spezifisch, kann jedoch gut zur Bestimmung der Harnsäure im Serum verwendet werden.

2.3.2.2.2 Reagenzien:

1. Schwefelsäure, 2-normal (Riedel de Haen 38291)
2. Natriumwolframat, p.a. (Merck 6673)
3. Reagens nach FOLIN-DENIS (Phosphorwolframsäure)
(Merck 9022)
4. Natriumsilikat-Glycerinlösung
(Merck 5623, p.a.
1 l = 1,11 kg)
5. Harnsäure p.a. (Merck 814)
6. Lithiumcarbonat reinst, DAB 6 (Merck 5671)
7. Formaldehydlösung, 35 Gew.-%, p.a.
(Merck 4003)

*) Nach Eppendorf-Firmendruckschrift für Mikroliterverfahren.

2.3.2.2.3 Herstellung der Lösungen:

1. Schwefelsäure, 1/12 N
10,4 ml 2 N-Schwefelsäure werden mit dest. Wasser auf 250 ml verdünnt.
2. Natriumwolframatlösung, 10 %ig
10,0 g Natriumwolframat werden in dest. Wasser gelöst und auf 100 ml verdünnt.
3. Harnsäure-Reagens 1 : 9 verdünnt
1 ml Reagens nach FOLIN-DENIS wird mit 8 ml dest. Wasser vermischt. Diese Verdünnung ist täglich frisch zu bereiten.
4. Harnsäure-Stammlösung (100 mg/100 ml)
500 mg Harnsäure (bis zur Gewichtskonstanz getrocknet) werden unter lebhaftem Schütteln oder Rühren in 75 ml 0,4 %iger Lithiumcarbonatlösung gelöst. Dann werden 20 ml Formaldehydlösung zugesetzt und auf ca. 250 ml verdünnt. Nach Zusatz von 6,25 ml 2 N-Schwefelsäure wird mit dest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank ist diese Lösung einige Wochen haltbar.

2.3.2.2.4.1 Arbeitsweise:

Man pipettiert in Reaktionsgefäße:

	Analyse	Blindprobe
Serum	50/ul	--
dest. Wasser	--	50/ul
1/12 N Schwefelsäure	500/ul	500/ul
Natriumwolframatlösung	50/ul	50/ul
verschließt die Gefäße, rüttelt 30 sec , läßt 5 min stehen und zentrifugiert eine Minute. Nun pipettiert man in neue Reaktionsgefäße:		

	Analyse	Blindprobe
klaren Überstand	200/ul	200/ul
Na-Silikat-Glycerin-Lösung	100/ul	100/ul
Harnsäurereagens 1 : 9	100/ul	100/ul
verschließt, rüttelt 30 sec und mißt genau 20 min nach Zugabe des Harnsäure-Reagenses die Extinktion des Serumansatzes mit Filter Hg 578 nm in 10 mm-Absaugküvetten gegen die auf E = 0 kompensierte Blindprobe.		

2.3.2.2.4.2 Berechnung:

$$x \ 67,5 = \text{mg Harnsäure/100 ml Serum}$$

Normalbereich:

Männer 2,0 - 7,6 mg Harnsäure/100 ml Serum

Frauen 1,8 - 6,5 mg Harnsäure/100 ml Serum (67).

2.3.2.2.5 Eichung:

Aus einer Bürette gibt man 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 und 10,0 ml der Harnsäure-Stammlösung in eine Reihe von 100-ml-Meßkolben und füllt mit dest. Wasser bis zur Marke auf. Mit je 50/ul dieser Standardlösungen, welche Konzentrationen von 2 - 4 - 6 - 8 und 10 mg Harnsäure/100 ml entsprechen, führt man den oben beschriebenen Ansatz (ohne Zentrifugieren) durch. Die gemessenen Extinktionen werden in einem Koordinatensystem gegen die Konzentrationen aufgetragen und müssen sich zwanglos durch eine Gerade verbinden lassen, die durch den Nullpunkt geht. Der aus der Steigung der Geraden berechnete Faktor (Konzentration : Extinktion) sollte um nicht mehr als $\pm 5 \%$ von dem oben angeführten Berechnungsfaktor 67,5 abweichen.

2.3.2.2.6 Anmerkungen:

1. Das Reagens nach FOLIN-DENIS darf höchstens leicht gelblich sein, sonst tritt eine nicht für Harnsäure spezifische Färbung bei der Reaktion auf.
2. Das verwendete Glycerin muß frisch und farblos sein, sonst erhöht sich der Blindwert, dessen Extinktion gegen Wasser gemessen nicht höher als 0,02 liegen sollte. Die Analysenwerte sind dann schlecht reproduzierbar.

2.3.2.2.7 Literatur: 23, 34, 41, 60, 61, 63, 64, 79, 95, 111, 126, 169.

2.3.2.3. Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Harnsäure-analyse

2.3.2.3.1 Präzisionskontrolle Milliliterverfahren

	$\bar{x}$	s	VK%
" Pathologisches " Schweineserum	14,6	1,57	11

2.3.2.3.2 Präzisionskontrolle Mikroliterverfahren

	$\bar{x}$	s	VK%
Moni-Trol I, Serie	5,67	0,091	1,6
Moni-Trol II X, Serie	10,56	0,34	3,2
Moni-Trol II X, T. T.	9,78	0,43	4,4
Moni-Trol II X, P. korr. T. T.	9,23	0,47	5,1

2.3.2.3.3 Richtigkeitskontrolle Mikroliterverfahren

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
Moni-Trol I, T. T.	5,5	5,80	0,25	4,3

2.3.2.3.4 Bemerkungen:

Der Harnsäurespiegel im Schweineserum ist zu niedrig, als daß man ihn für eine sinnvolle Präzisionskontrolle verwenden könnte (zwischen 0,1 und 0,5 mg/100 ml). Auch ist Harnsäure in flüssigen Kontrollseren schlecht oder nicht lange haltbar, so daß sie bei beiden Ringversuchen im Programm fehlte. Die geringe Haltbarkeit ist sicher auch der Grund, warum die Präzisionskontrolle mit dem "pathologischen" Schweineserum so schlecht ausfiel. Die Präzision in der Serie und von Tag zu Tag bei der Kontrolle mit Moni-Trols ist ausreichend. Bei der Kontrolle der Richtigkeit mit Moni-Trol I liegen unsere Ergebnisse um 5 % zu hoch, was klinisch noch toleriert werden kann. Berechnet man das Ergebnis des Präzisionskontrollserums nach dem Ergebnis der Richtigkeitskontrolle, so ist die Präzision schlechter, als wenn man es nach dem angegebenen Faktor ermittelt, was bedeutet, daß die Ergebnisse unregelmäßig (ohne Tendenz) streuen.

Es bestand zunächst die Absicht, die Bestimmung der Harnsäure mit Hilfe der Uricase-Methode (Boehringer-Firmendruckschrift, Auflage 1969) vorzunehmen. Das Verfahren wurde eingehend geprüft. Obwohl diese Art der Harnsäurebestimmung für wissenschaftliche Zwecke wegen ihrer Spezifität zweifellos der colorimetrischen Reaktion überlegen ist, hat sie jedoch im Vergleich mit dieser für die klinisch-chemische Routine einige Nachteile:

- Der Analysengang ist zeitraubender und umständlicher.
- Die Extinktionsdifferenz pro mg% Harnsäure ist selbst bei einer Messung bei 293 nm geringer als bei der colorimetrischen Reaktion, deshalb ist eine äußerst saubere Arbeitsweise nötig. Ist dies in der Routine nicht gewährleistet, so wird der Vorteil der Spezifität durch den größeren methodischen Fehler zunichte gemacht.
- Eine enzymatische Analyse kostet etwa das zwanzig-

fache einer colorimetrischen.

- Das Laborpersonal wies die Bedienung des vorhandenen Spektralphotometers PM Q II (Carl Zeiss, Oberkochen, Tannus) als umständlich und verwirrend zurück.

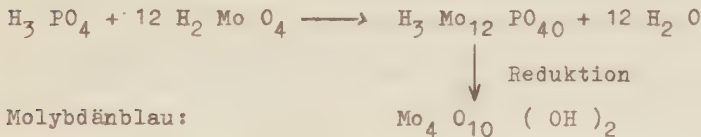
Da die Genauigkeit der colorimetrischen Methode zudem in den allermeisten Fällen für die klinischen Belange ausreicht, entschied man sich für diese.

2.3.3 Bestimmung von Phosphor in Serum und Harn

2.3.3.1 Milliliterverfahren - Phosphor

2.3.3.1.1 Prinzip:

Orthophosphat reagiert mit Molybdänsäure zu Phosphomolybdänsäure. Diese wird durch Hydrochinon zu " Molybdänblau " reduziert. Dieser Farbstoff wird durch Zusatz von Carbonatsulfitlösung stabilisiert. Die Menge des enthaltenen Orthophosphats ist der Farbintensität proportional.



2.3.3.1.2 Reagenzien:

- 1) Trichloressigsäure (Merck p.a. 807)
- 2) Hydrochinon (Merck p.a. 4610, reinst Erg. B 6)
- 3) Konzentrierte Schwefelsäure (Merck p.a. 731)
- 4) Ammoniummolybdat (Merck p.a. 1182)
- 5) Natriumcarbonat (Merck p.a. 6392)
- 6) Natriumsulfit (Merck p.a. 6656)
- 7) Kaliumphosphat primär nach SØRENSEN.

2.3.3.1.3 Herstellung der Lösungen:

- 1) Trichloressigsäurelösung 20 %ig: 200 g Trichloressigsäure werden mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.
- 2) Reduktionslösung: 2 g Hydrochinon werden im 100 ml-Meßkölbchen in dest. Wasser gelöst. Man füllt bis zur Marke auf und fügt noch 0,1 ml konzentrierte Schwefelsäure zu.

- 3) Ammoniummolybdatlösung 5 %ig: 50 g Ammoniumheptamolybdat werden in 1000 ml phosphorsäurefreier $N - H_2 SO_4$ unter leichtem Erwärmen gelöst und, wenn nötig, filtriert.
- 4) Natriumcarbonatlösung: In einem 100-ml-Meßkolben werden 7,41 g wasserfreies Natriumcarbonat gelöst und bis zur Marke aufgefüllt.
- 5) Natriumsulfitlösung: 3,75 g wasserfreies Natriumsulfit werden in einem 50-ml-Meßkolben mit dest. Wasser gelöst. Man füllt bis zur Marke auf.
- 6) Carbonatsulfitlösung:
 - 1 Teil Natriumsulfitlösung
 - 2 Teile Natriumcarbonatlösung.

Nb: Die Lösungen 2, 3, 4 und 5 werden im Kühlschrank bei $+ 4^{\circ} C$ aufbewahrt.

2.3.3.1.4 Arbeitsgang:

- 2.3.3.1.4.1 Geräte:
- a) 25-ml-Meßkölbchen
 - b) 2,5-ml-Stabpipette
 - c) 10-ml-Stabpipette
 - d) 5-ml-Stabpipette

2.3.3.1.4.2 Pipettierschema: Phosphor im Serum

	Analyse	Blindprobe	Geräte
Serum	2,5 ml	---	mit b in a
dest. Wasser	2-3 ml	---	c
Trichloressigsäurelösung	10,0 ml	---	c
Man füllt bis zur Marke mit dest. Wasser auf, schüttelt und filtriert durch einen Faltenfilter in einen Erlenmeyerkolben.			

	Analyse	Blindprobe	Geräte
Serumfiltrat	10,0 ml	---	c
dest. Wasser	--	10,0 ml	c
Ammoniummolybdatlösung	1,0 ml	1,0 ml	d
Hydrochinonlösung	2,0 ml	2,0 ml	c
schütteln und 10 min bei Zimmertemperatur stehen lassen.			
Carbonatsulfitlösung	5,0 ml	5,0 ml	c
bis zur Marke mit dest. Wasser auffüllen und weitere 5 min bei Zimmertemperatur stehen lassen. Extinktionsmessung im Photometer Eppendorf mit Filter 578 nm in einer 10-mm-Küvette. Die Nullpunkteinstellung erfolgt auf die Blindprobe, die doppelt angesetzt wird und nicht blau verfärbt sein darf (Unreinheit der Glasgeräte).			

2.3.3.1.5 Berechnung:

Die Konzentration von Phosphor im Serum erhält man nach einer Eichkurve, nach der in unserem Fall einer Konzentration von 10 mg Phosphor in 100 ml Serum eine Extinktion von 0,360 entsprach.

Normalwerte:

Erwachsene: 2,5 - 4,1 mg Phosphor/100 ml Serum (67)

Kinder und Jugendliche (1 bis 19 Jahre):

3,6 - 5,9 mg Phosphor/100 ml Serum (67)

" Der Plasmaphosphatspiegel untersteht mannigfaltigen Einflüssen. Neben der Aufnahme, die von der Zusammensetzung der Nahrung abhängt, und der Ausscheidung, die hauptsächlich über den proximalen Nierentubulus reguliert wird,

spielt der Austausch zwischen intra- und extrazellulärem Phosphat eine große Rolle Die Höhe des anorganischen Serumphosphates wird ferner maßgeblich durch das Zusammenspiel der Hormone bestimmt: Während das Wachstumshormon (beim Kind und bei der Akromegalie) den Spiegel hebt, haben Östrogene und Parathormon den gegensinnigen Effekt. Der Serumphosphorspiegel liegt bei der menstruierenden Frau tiefer als vor der Menarche oder nach der Menopause. 95 % des anorganischen Phosphates sind im Blut in ungebundener Form und nur 5 % an Eiweiß gekoppelt vorhanden, 5 %, die für die Berechnung der Clearance vernachlässigt werden können." (Aus HAAS, .76).

2.3.3.1.6 Eichung:

- 1) Phosphor-Stammlösung (10 mg P/100 ml): 220 mg primäres Kaliumphosphat (bis zur Gewichtskonstanz getrocknet) werden mit dest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt.
- 2) Durch Verdünnung stellt man sich Konzentrationen von 2, 4, 6 und 8 mg Phosphor/100 ml her und führt mit ihnen den oben beschriebenen Analysengang aus. Die Extinktionen ergeben, in ein geeignetes Koordinatensystem gegen die Konzentrationen aufgetragen, eine Gerade, die durch den Nullpunkt gehen muß.

2.3.3.1.7 Bestimmung im Harn:

2,5 ml Harn werden in einem 25-ml-Meßkolben mit 2,5 ml 10 %iger Trichloressigsäurelösung versetzt. Man füllt mit dest. Wasser bis zur Marke auf, schüttelt und filtriert. 1 ml Filtrat wird mit 9 ml 2-%iger Trichloressigsäure versetzt. Diese 10 ml werden an Stelle der 10 ml Serumfiltrat in den Analysengang der Phosphorbestimmung im Serum eingesetzt. Das Ergebnis ist mit 10 zu multiplizieren. (Siehe auch 2.3.3.2.7 : Anmerkung 3 und 4.)

Literatur siehe Mikroliterverfahren.

2.3.3.2 Phosphorbestimmung - Mikroliterverfahren*

2.3.3.2.1 Prinzip:

Unter anorganischem Phosphor versteht man den Anteil an Phosphaten, der bei Enteiweißung des Serums mit Trichloressigsäure im Filtrat verbleibt und ohne zusätzliche Hydrolyse mit Molybdat zu Phosphormolybdänsäure reagiert. Diese wird mit einem Reduktionsmittel (Ascorbinsäure) zu Molybdänblau umgesetzt. Die Extinktion der Probe wird in 10-mm-Absaug-Mikroküvetten bei 578 nm gemessen.

2.3.3.2.2 Reagenzien:

1. Schwefelsäure p.a., D = 1,84 (Merck 731)
2. Ammoniummolybdat (p.a. Merck 1182)
3. Ascorbinsäure (Merck p.a. 127)
4. Trichloressigsäure (Merck DAB 6 krist. 810)
5. Kaliumphosphat, primär, n. SØRENSEN (Merck 4873)

2.3.3.2.3 Herstellung der Lösungen:

1. Ammoniummolybdatlösung: Man gießt langsam 16 ml Schwefelsäure D = 1,84 unter Rühren in 43,5 ml bidest. Wasser. Die so erhaltene 10-N-Schwefelsäure läßt man abkühlen. 5 g fein gepulvertes Ammoniummolybdat werden unter Rühren, notfalls unter Erwärmen auf 60° C, in 40 ml bidest. Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen wird die Molybdatlösung langsam unter Rühren in 50 ml der 10 N-Schwefelsäure eingegossen. Die Lösung ist dann auf 100 ml zu verdünnen und ist unbegrenzt haltbar.

*) Modifiziert nach Eppendorf-Firmendruckschrift für Mikroliterverfahren

2. Reduktionslösung: 250 mg Ascorbinsäure abwiegen und mit 5 ml dest. Wasser lösen. Die Lösung ist nur einen Tag haltbar und deshalb täglich frisch anzusetzen!
3. Trichloressigsäurelösung, 10 %ig: 10 g kristallisierte Trichloressigsäure wird in einem 100-ml-Meßkolben in etwa 70 ml dest. Wasser gelöst und anschließend auf 100 ml aufgefüllt.
4. Phosphor-Stammlösung (10 mg P/100 ml): 220 mg primär. Kaliumphosphat (über Nacht bei 80° C getrocknet) werden eingewogen und in einem Meßkolben in 500 ml bidest. Wasser gelöst. Nach Zugabe einiger Tropfen Toluol ist die Lösung längere Zeit haltbar.

2.3.3.2.4 Arbeitsweise:

Pipettierschema:

In je ein <u>sauberes</u> Reaktionsgefäß pipettieren	Blindprobe	Analyse
Serum bzw. Urin (wenn nötig 1 : 11 verdünnt)	---	50 μ l
dest. Wasser	50 μ l	--
Trichloressigsäurelösung	200 μ l	200 μ l
Die Reaktionsgefäße werden verschlossen und 30 sec gerüttelt, anschließend 1 min bei 16000 U/min zentrifugiert. Nun pipettiert man:		
Überstand	100 μ l	100 μ l
Ammoniummolybdat	200 μ l	200 μ l
Reduktionslösung	200 μ l	200 μ l

Man verschließt und rüttelt 30 sec, nach genau 15 Minuten mißt man die Extinktion der Serumprobe in der 10-mm-Ab-saug-Mikroküvette bei 578 nm, nachdem der Nullpunkt auf die Blindprobe eingestellt worden ist.

2.3.3.2.5 Berechnung:

$\Delta E \times 18 = \text{mg P}/100 \text{ ml}$ (Anmerkung 2)

Normalwerte:

2,5 - 4,2 mg P/100 ml Serum s. 2.3.3.1.5

2.3.3.2.6 Eichung:

Von der oben angesetzten Phosphor-Stammlösung (10 mg P/100 ml) pipettiert man in zwei 50-ml-Kolben 10 bzw. 30 ml und füllt mit bidest. Wasser auf. So gelangt man zu Standardlösungen mit 10, 6 und 2 mg P/100 ml, von denen je 50 μ l an Stelle des Serums eingesetzt werden. Die vorteilhaft aus Doppel- oder Dreifachbestimmungen ermittelten Extinktionen trägt man gegen die Konzentrationen in einem Koordinatensystem auf. Die Verbindung der Meßpunkte muß eine Gerade sein, die durch den Nullpunkt geht. Der aus ihrer Steigung ermittelte Faktor sollte nicht mehr als $\pm 5 \%$ von dem angegebenen abweichen.

2.3.3.2.7 Anmerkungen:

1. Die Reaktion ist sehr empfindlich, geringste Verunreinigungen (Staub !) stören stark. Die Extinktion der Blindprobe, gegen dest. Wasser gemessen, darf 0,03 nicht überschreiten.
2. Die Eichkurve sollte möglichst oft mit einem Standardserum oder einer Standardlösung kontrolliert werden. Der angegebene Faktor wurde sowohl mit wässrigen Standardlösungen wie mit Kontrollseren ermittelt.

3. " Die Phosphatausscheidung folgt einem wahrscheinlich tubulär bedingten 24-h-Rhythmus. Sie ist in den frühen Morgenstunden am niedrigsten, steigt dann im Laufe des Tages an und erreicht in den frühen Abendstunden ihr Maximum. (Damit zeigt sie ein zur Cortisolsekretion gerade umgekehrtes Verhalten .) Dieses Phänomen kann für die Diagnostik verwendet werden, macht aber Methoden, bei denen die Phosphatausscheidung vor einer Calciuminfusion am Morgen und unmittelbar anschließend am Mittag bestimmt wird, unbrauchbar." (Aus HAAS, 76 .)
4. Die Phosphatausscheidung hängt erwiesenermaßen sehr stark von der Phosphataufnahme ab. Wenn die Zufuhr zu niedrig ist, sinkt die Phosphatausscheidung auf tiefe Werte ab und wird für die Diagnostik nicht mehr verwertbar. Es ist daher wenig sinnvoll, die 24-h-Urinphosphatausscheidung für die Diagnostik heranzuziehen. (Nach HAAS, 76 .)

Literatur: 23, 34, 44, 55, 56, 70, 76, 105, 111, 126, 160, 169.

2.3.3.3 Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Phosphoranalyse

2.3.3.3.1 Präzisionskontrolle Milliliterverfahren

	$\bar{x}$	s	VK%
1. Ringversuch, T. T.			
1. Ergebnis	2,91	0,14	5,0
2. Ergebnis	2,86	0,09	3,0
Schweineserum, T. T.	8,64	1,68	19

2.3.3.3.2 Präzisionskontrolle Mikroliterverfahren

	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.,			
1. Ergebnis	5,53	0,43	7,8
2. Ergebnis	5,61	0,54	9,7
Moni-Trol II X, T. T.	6,86	0,35	5,1
Moni-Trol II X, T. T., P. korr.	6,32	0,35	5,55

2.3.3.3.3 Richtigkeitskontrolle Mikroliterverfahren

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.,				
1. Ergebnis	4,00	3,74	0,28	7,5
2. Ergebnis		3,90	0,36	9,2
Moni-Trol I	3,7	4,03	0,28	6,9

2.3.3.3.4 Bemerkungen

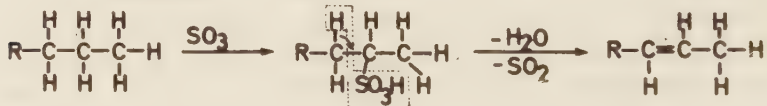
Traut man den Ergebnissen des 1. Ringversuches, so sind die des Mikroliterverfahrens weniger befriedigend, was mit der außerordentlichen Empfindlichkeit (Staub !) des letzteren zusammenhängen kann. Hier muß noch auf eine Verbesserung des Verfahrens abgezielt werden. Gegen einen Sollwert von 4,00 mg/100 ml bei der Richtigkeitskontrolle spricht der Mittelwert aller sich beteiligenden Labors (148) mit $\bar{x} = 3,86$, was mit unseren Ergebnissen übereinstimmen würde. Allerdings finden wir mit unserer Modifikation in Moni-Trol I einen um 8 % höheren Wert.

2.3.4 Bestimmung von Cholesterin im Serum

2.3.4.1 Milliliterverfahren - Cholesterin

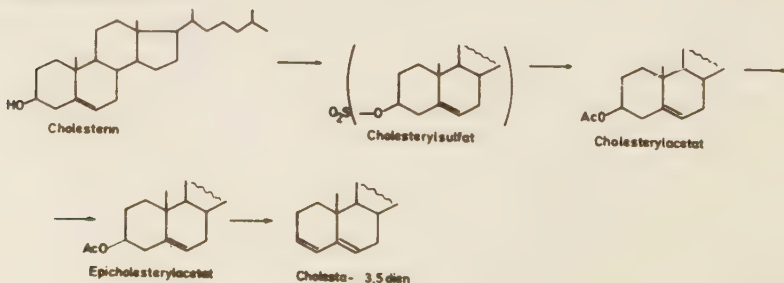
2.3.4.1.1 Prinzip:

Man enteiweißt Serum mit Aether-Alkohol, filtriert und dampft das Filtrat, das die Lipide enthält, auf dem Sandbad ein. In dem mit Chloroform aufgenommenen Rückstand stellt man die Reaktion nach LIEBERMANN und BURCHARD an, deren blaugrün gefärbte Endprodukte eine Absorptionsbande bei mindestens 605 nm aufweisen. Obwohl diese Reaktion schon lange bekannt ist, ist der ihr zugrunde liegende chemische Mechanismus wegen der weitgehenden Unbeständigkeit der Farbkomplexe noch wenig geklärt. Der folgende Vorschlag stammt von BRIESKORN und HOFMANN (24). Der erste Schritt scheint der Aufbau einer Reihe von Doppelbindungen zu sein, ähnlich derjenigen bei der Behandlung eines Alkans mit rauchender Schwefelsäure:

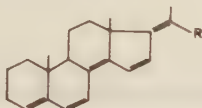


Pro Mol Cholesterin werden mindestens 3 Mol SO_2 gebildet. Daneben erfolgt mit Sicherheit auch Sulfonierung, wie die vermehrte Wasserlöslichkeit des Reaktionsansatzes im Verlauf der L. B. R. zu erkennen gibt.

Die L. B. R. mußte demnach durch folgende Schritte eingeleitet werden:



Eine weitere Konjugation ist durch Auftreten einer Doppelbindung am C - 7 denkbar, da die Position 7 der Sterinmolekel oxydativen Angriffen zugänglich ist. Auch eine Doppelbindung in der Seitenkette bewirkt Farbvertiefung. BRIESKORN und HOFMANN (24) stellen folgendes Pentaen zur Diskussion:



Weiter ist anzunehmen, daß die Polyenkette in ihren polaren Grenzzuständen Säurekationen und -anionen, in diesem Falle $\text{SO}_3 \text{H}^+$ und OH^- bzw. HSO_4^- , reversibel anlagert. Die größte Farbvertiefung wird erreicht, wenn die angelagerten Ionen bei einer langen Kette von Doppelbindungen möglichst weit voneinander entfernt sind, was im Falle einer geringen Säurekonzentration (Verdünnung durch Acetanhydrid !) am besten möglich ist. Erhöhen des Schwefelsäureanteils hat eine hypsochrome Verschiebung der Absorptionsbande zur Folge, weil durch vermehrte Anlagerung der Säure eine Aufspaltung der Doppelbindungskette in kleinere, unabhängig voneinander absorbierende Chromophore erfolgt.

2.3.4.1.2 Reagenzien:

- 1) Chloroform (Merck p.a. 2445)
- 2) Tetrachlorkohlenstoff (Merck p.a. 2222)
- 3) Essigsäureanhydrid (Merck p.a. 42)
- 4) Konzentrierte Schwefelsäure 95-97 %ig
(Merck p.a. 731)
- 5) Digitonin, 1 %ig in 96 %igem Alkohol:
1 g Digitonin (Merck p.a. 3043) wird in einem 100-ml-Meßkolben in 96 %igem Alkohol auf dem siedenden Wasserbad gelöst und nach dem Abkühlen auf 20°C bis zur Marke mit Alkohol aufgefüllt.

- 6) Aether-Alkohol-Gemisch: zum Enteiweißen
1 Teil Diaethylaether (Merck p.a. 921) und
3 Teile Aetanol absolut (Merck p.a. 972).
- 7) Essigsäure ca. 96 %ig p.a.

2.3.4.1.3 Arbeitsgang:

2.3.4.1.3.1 Geräte:

iedendes Wasserbad
50-ml-Meßkolben (trocken; vor Gebrauch mit Chloroform spülen)
1-ml-Vollpipette (für Serum)
Glastrichter, Faltenfilter
100-ml-Erlenmeyerkolben
20-ml-Pipette mit Handpumpe (für Chloroform)
Porzellanschale
Sandbad (mit 150 - 200° C)
10-ml-Schüttelmensur mit eingeschliffenem Glasstopfen
Glastrichter mit Wattefilter
2-ml-Vollpipette (für Essigsäureanhydridlösung)
0,5-ml-Stabpipette (für Schwefelsäure)
20-mm-Küvette und Photometer Eppendorf

2.3.4.1.3.2 Enteiweißen: 1 ml Serum wird in den 50-ml-Meßkolben pipettiert. Man setzt tropfenweise Aether-Alkohol zu, bis alles Eiweiß ausgefällt ist, und füllt etwa zur Hälfte mit Aether-Alkohol auf. Zur vollständigen Ausfällung wird der Kolben in einem siedenden Wasserbad schüttelnd bewegt, bis der Alkohol zu sieden beginnt. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur unter der Wasserleitung füllt man mit Aether-Alkohol bis zur Marke auf und filtriert durch den Faltenfilter in den 100-ml-Erlenmeyerkolben.

2.3.4.1.3.3 Gesamt-Cholesterin-Bestimmung: 10 ml Filtrat kommen in eine kleine Porzellanschale und werden auf dem Sandbad bis zur Trockene eingengt, jedoch nicht zu stark gebräunt. Der Rückstand wird mit kleinen

Portionen Chloroform (etwa 1 - 2 ml) quantitativ in einen Trichter mit Wattefilter gespült und in die 10-ml-Schüttelmensur filtriert, bis genau 5 ml Filtrat in der Mensur sind. Dazu pipettiert man:
2 ml Essigsäureanhydrid und
0,1 ml konzentrierte Schwefelsäure, mischt durch Schütteln und läßt 10 min im Dunkeln stehen.

2.3.4.1.3.4 Cholesterinester: 10 ml Filtrat werden mit 1 ml Digitoninlösung in eine Porzellanschale pipettiert und bis zur Trockene eingedampft. Man setzt ca. 10 ml Tetrachlorkohlenstoff zu und engt auf 1 bis 1 1/2 ml ein und filtriert in drei Portionen wie beim Gesamtcholesterin in die ebenso vorbereitete Mensur. Nach dem Nachspülen von Schale und Filter mit Tetrachlorkohlenstoff füllt man auch hier mit Chloroform auf 5 ml auf. Dazu pipettiert man:
2 ml Essigsäureanhydrid und
0,1 ml konz. Schwefelsäure, mischt durch Schütteln und läßt 10 min im Dunkeln stehen.

2.3.4.1.3.5 Extinktionsmessung im Photometer Eppendorf in einer 20-mm-Küvette mit Filter 578 nm. Der Nullpunkt wird auf Luft eingestellt.

2.3.4.1.4 Berechnung:

Die Konzentration des Cholesterins im Serum erhält man nach einer selbst erstellten Eichkurve, nach der 100 mg Cholesterin in 100 ml Serum einer Extinktion von 0,175 entsprechen.

<u>Normalwerte:</u> Gesamtcholesterin	180 - 220 mg/100 ml
Cholesterinester	90 - 130 ml/100 ml

2.3.4.1.5 Eichung:

- 1) Cholesterinstammlösung: 400 mg Cholesterin werden in einem 100-ml-Meßkolben unter leichtem Er-

wärmen in etwa 90 ml Essigsäure gelöst. Nach dem Erkalten füllt man bis zur Marke auf.

- 2) Durch Verdünnung mit Essigsäure stellt man sich Konzentrationen von 300, 200 und 100 mg Cholesterin/100 ml her und führt damit den oben beschriebenen Analysengang aus. Durch Eintragung der erhaltenen Werte in ein geeignetes Koordinatensystem gegen die Konzentrationen erhält man eine Eichgerade, die durch den Nullpunkt gehen muß.

Literatur siehe Mikroliterverfahren

2.3.4.2 Gesamtcholesterin - Mikrolitermethode

2.3.4.2.1 Prinzip:

Die vorliegende Methode arbeitet ohne die Abtrennung des Eiweißes, ist somit sehr einfach und rasch durchzuführen. Die bei Zugabe von Cholesterinreagens zum Serum ausfallenden Bestandteile werden durch 2,5-Dimethylbenzolsulfonsäure und Schwefelsäure dispergiert. Die in essigsaurem Medium durchgeführte LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion ergibt praktisch keine Differenzen zwischen Gesamtcholesterin und Cholesterinester. Die entstehende blau-grüne Farbe wird in 20-mm-Absaugküvetten bei 578 nm gemessen.

Da die Reaktion vom Wassergehalt der Reagenzien abhängt, ist das Mitführen eines Cholesterinstandards oder Kontrollserums notwendig.

Reaktionsschema siehe bei der Beschreibung des Milliliterverfahrens.

2.3.4.2.2 Reagenzien: Testpackung "Cholesterin" der Firma

Boehringer, Mannheim, TC-CH, Best. Nr. 15949 TCAA.

Konzentrationen der Lösungen:

- 1) 200 mg Cholesterin in 100 ml Eisessig.

2) Cholesterinreagens: 0,05 M Dimethylbenzolsulfonsäure; 7,0 M Essigsäure; 6,5 M Essigsäureanhydrid.

3) Konz. Schwefelsäure (Merck p.a. 731).

Die Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert und sind bei Raumtemperatur ca. 1 Jahr haltbar. Sie sollen stets gut verschlossen aufbewahrt werden.

2.3.4.2.3 Arbeitsweise: *

In Reaktionsgefäße pipettieren:			
	Leerwert	Standard	Probe
dest. Wasser	20/ul	--	--
Lösung 1 (Standard)	--	20/ul	--
Serum	--	--	20/ul
Lösung 2 (Cholesterinreagens)	500/ul	500/ul	500/ul
Gefäße verschließen, 30 sec mischen und 5 min im Thermostaten bei 25° C stehen lassen.			
Schwefelsäure	100/ul	100/ul	100/ul
Jedes Gefäß sofort nach Zugabe der Schwefelsäure verschließen und durch dreimaliges Umkippen gründlich mischen. Anschließend bei 25° C 10 min im Thermostaten kühlen. Man zentrifugiert 15 sec, um etwa untergemischte Luftblasen aus der Lösung zu entfernen, und überführt je 400/ul des Ansatzes in eine 20-mm-Absaugküvette. Der Leerwert wird auf E = 0 kompensiert und die Extinktion von Standard und Analyse bei 578 nm dagegen abgelesen.			

2.3.4.2.4 Berechnung:

$$\frac{E_{\text{Serumansatz}}}{E_{\text{Standardansatz}}} \times 200 = \text{mg Cholesterin/100 ml Serum.}$$

*) Boehringer-Firmendruckschrift zum Mikrolitersystem

Normalbereich: 150 - 280 mg Cholesterin/100 ml Serum
(Altersabhängigkeit!)

Eichung: siehe bei der Beschreibung des Milliliter-
verfahrens (2.3.4.1.5).

2.3.4.2.5 Hinweise:

- 1) Bei stark bilirubinhaltigen und hämolytischen Se-
ren findet man eine zu hohe Extinktion.
10 mg Bilirubin/100 ml Serum führt zu einer
scheinbaren Erhöhung der Cholesterinkonzentration
von ca. 30 mg/100 ml Serum.
- 2) Es ist besonders darauf zu achten, daß Reaktions-
gefäße, Pipettenspitzen und Küvetten vollkommen
trocken sind.

2.3.4.2.6 Literatur: 7, 8, 12, 24, 30, 34, 36, 42, 111,
118, 126, 140.

2.3.4.3 Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Cholesterin-
analyse

2.3.4.3.1 Präzisionskontrolle Milliliterverfahren

	$\bar{x}$	s	VK%
Schweineserum	122,5	12,78	10,4

2.3.4.3.2 Präzisionskontrolle Mikroliterverfahren

	$\bar{x}$	s	VK%
Moni-Trol I, Serie	165,2	2,8	1,7
Moni-Trol II X, Serie	136,2	3,08	2,3
Moni-Trol II X, T. T.	132,22	5,37	4,05
Moni-Trol II X, P. korr.	129,12	4,87	3,76

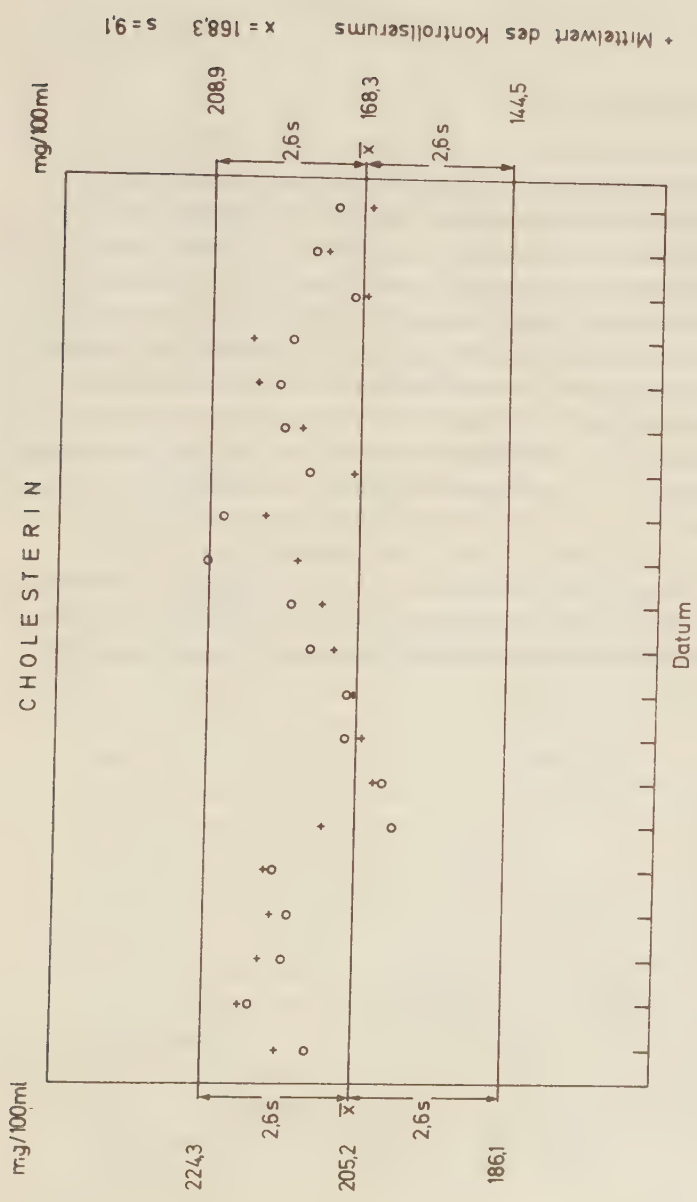


Abb. 11 : Qualitätskontrollkarte für Cholesterin für die Kontrollperiode von 4. 5. bis 3. 6. 1970. Kontrollserum Moni-Trol I.

2.3.4.3.3 Richtigkeitskontrolle Mikroliterverfahren

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
Moni-Trol I	164,0	165,48	6,55	3,96

2.3.4.3.4 Bemerkungen:

Obwohl die Ergebnisse der Qualitätskontrolle mit Schweineserum allgemein nicht befriedigend waren, kann man doch darüberhinaus hier sagen, daß die Cholesterin-Millilitermethode durch die vielen umständlichen Reaktions-schritte großen Störungen ausgesetzt war. Hier brachte das Mikroliterverfahren einen bedeutenden Gewinn an Genauigkeit. Auffallend ist die große Übereinstimmung der Tendenzen der Werte aus dem Kontrollserum und der Mittelwerte der Normalwerte ($\bar{N}$). Diese Tatsache spricht für einen täglich wechselnden systematischen Fehler. Dieser kann bei der vorliegenden Methode am ehesten beim Pipettieren des Eichstandards unterlaufen. Hier zeigt sich deutlich die Brauchbarkeit und Nützlichkeit der Beobachtung von $\bar{N}$. Ebenso für einen systematischen Fehler spricht die Verbesserung der Präzision, wenn man die Kontrollprobe nach dem Ergebnis der Richtigkeitskontrolle als primärem Standard berechnet.

2.3.5 Die Bestimmung der Elektrolyte Natrium, Kalium und Calcium mit dem Zeiss-Flammenphotometer PF 5

2.3.5.1 Methodik:

2.3.5.1.1 Prinzip:

Verdünntes Serum wird mit Preßluft in einer Glaszerstäuber-
kammer vernebelt. Dieser Nebel wird in eine Acetylen-Preßluft-
Flamme eingeblasen. Mit verschiedenen Filtern werden aus dem
entstehenden Mischlicht in drei aufeinander folgenden Analysen-
gängen die Konzentrationen der Elemente Natrium, Kalium und
Calcium quantitativ photometrisch gemessen. Die Störungen bei
der Kaliumbestimmung durch Natrium und Calcium bzw. bei der
Calciumbestimmung durch Natrium und Kalium werden durch die
Verwendung sog. Blindlösungen als Leerwert praktisch kompensiert.

2.3.5.1.2 Reagenzien:

- 1) Netzmittel "Sterox". Zum Spülen des Zerstäubers, als
Leerwert für die Natriumbestimmung und als Verdünnungsmittel
für das Serum wird destilliertes Wasser verwendet, dem 0,02 %
eines alkali- und erdalkalifreien Netzmittels zugesetzt sind, um
einen einwandfreien Durchfluß der Flüssigkeit durch Ansaug-
kapillare und Zerstäuber zu gewährleisten.
- 2) Blindlösung für die Kaliumanalyse:
Eine Ampulle Titrisol^R Merck 9977 wird über einem 1-l-
Meßzylinder mit einem Glasstab durchgestoßen. Die Ampulle
und der Glasstab werden mit viel destilliertem Wasser nach-
gespült, der Inhalt des Meßkolbens bis zur Marke mit dest.
Wasser aufgefüllt. Ein Liter Blindlösung enthält 3,30 g Na-
trium und 0,100 g Calcium. Zur Nullpunkteinstellung werden
die Blindlösungen ebenso wie Serum verdünnt.

3) Blindlösung für die Calciumbestimmung:

Der Inhalt einer Ampulle Titrisol^R Merck 9978 wird, wie unter 2) beschrieben, quantitativ in einen 1-l-Meßkolben überführt und der Kolben bis zur Marke mit dest. Wasser aufgefüllt. Ein Liter Blindlösung enthält 3,30 g Natrium und 0,15 g Kalium.

- 4) Eichlösung: Zur Eichung hat sich ein flüssiges Kontrollserum bekannten Elektrolytgehaltes (Lab-Trol^R, Dade) besser bewährt als eine sog. Haupteichlösung (primärer Standard). Es wird wie Serum verdünnt (s.u.). Das Flammenphotometer wird auf die vom Hersteller angegebenen Konzentrationen eingestellt.

2.3.5.1.3 Arbeitsweise:

Bedienungsanleitung des Gerätes in Stichworten: *

Vorbereitung:

- 1) Hauptschalter auf Mittelstellung
Kontrolle des mechanischen Nullpunktes
- 2) Hauptschalter auf Stellung I
Kontrolle des elektrischen Nullpunktes am betriebswarmen Gerät.
Dämpfungsstufe II
Hochspannungsstufe II oder III.
- 3) Vorbereiten von Probe und Lösung:
 - a) Zur Natriumbestimmung: 100 μ l Serum werden in einem Einmal-Polystyroltöpfchen unter Verwendung einer "Cipette" (eingestelltes Hubvolumen 9,90 ml) auf 10 ml mit netzmittelhaltigem dest. Wasser verdünnt (Verdünnung 1:100).

*) Nach Zeiss-Firmendruckschrift zum PF 5

- b) Zur Kalium- und Calciumbestimmung: 500 μ l Serum werden in gleicher Weise ("Cipette", Hubvolumen 9,50 ml) mit dest. Wasser (netzmittelhaltig) verdünnt (Verdünnung 1:20).
- 4) Kontrolle der Flaschendrucke
Dichtigkeitsprüfung nach Flaschenwechsel
Gasflaschen nie ganz entleeren! (Flaschendruck nicht unter 3 kp/cm²)
- 5) Zur Freigabe von Preßluft:
Öffnen des Flaschenventils
Öffnen des Vordruckventils
Einstellen des Feindruckes auf 1,0 kp/cm²
Kontrolle der Zerstäubung mit netzmittelhaltigem dest. Wasser
- 6) Zur Freigabe des Brenngases:
Öffnen des Flaschenventils
Öffnen des Vordruckventils
Einstellen des Feindruckes auf 100 mm Wassersäule
- 7) Nach Ablauf der Wartezeit von ca. 3 sec Zünder betätigen

Messen:

- 8) Filter wählen (Natrium 589 nm, Kalium 767 nm, Calcium 620 nm)
- 9) Eichlösung zerstäuben
Grobeinstellung der Anzeige auf Eichwert nahe Skalenende
Wenn nötig, Verstärkungsreserve am Hochspannungsschalter ausnützen.
- 10) Blindlösung zerstäuben (für die Natriumbestimmung das reine Lösungsmittel)
Grobkompensation und Feinkompensation der Anzeige auf Skalenwert 0
- 11) Eichlösung zerstäuben
Feineinstellung der Anzeige auf Eichwert
- 12) Probenlösung zerstäuben, Meßwert ablesen

Aqua bidest. zerstäuben

Gerät abschalten:

- 13) Schließen des Flaschenventils für Brenngas
Schließen des Vordruckventils für Brenngas
Nach Erlöschen der Flamme:
- 14) Zerstäuben von Verdünnungslösung (Reinigen der
Kanüle), zuletzt immer Aqua bidest.
(Spülen der Kanüle)
Schließen des Flaschenventils für Preßluft
Schließen des Vordruckventils für Preßluft
- 15) Hauptschalter auf Null

2.3.5.1.4 Hinweise:

- 1) Die Konzentrationen an Elektrolyten sind sofort
in mval/l abzulesen.
- 2) Der Zerstäuber benötigt etwa 4 ml Flüssigkeit
pro Minute.
- 3) Zum Säubern der Kanüle kann Verdünnungslösung
(mit Netzmittelzusatz) unter erhöhtem Preßluft-
druck (2 bis 3 kp/cm²) vernebelt werden.
- 4) Die Hubvolumina der Pipetten sind in regelmäßigen
Zeitabständen durch Auswiegen auf einer Feinwaage
zu kontrollieren.
- 5) Durch Verwendung von Kunststoffeinmalgefäßen wer-
den Ionenaustauschvorgänge an der Glasoberfläche
und Verunreinigungen durch Spülrückstände vermie-
den.

2.3.5.1.5 Normalbereiche: (67)

Natrium: 135 - 148 mval/l
Kalium : 3,6 - 5,2 mval/l
Calcium: 4,5 - 5,3 mval/l

Für Na⁺, K⁺ und Ca⁺⁺ ist der Serumproteingehalt,

ev. das Blut- p_H zu berücksichtigen. Nomographische Korrekturen können über das biologisch wichtige freie Serumcalcium Auskunft geben (67, Seite 561).

2.3.5.1.6 Literatur: 80, 121, 149, 172.

2.3.5.2 Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Elektrolytbestimmung

2.3.5.2.1 Natrium

2.3.5.2.1.1 Präzisionskontrolle Milliliterverfahren

	$\bar{x}$	s	VK%
1. Ringversuch, T. T.,			
1. Ergebnis	117,8	2,5	2,1
2. Ergebnis	115,9	1,7	1,4

2.3.5.2.1.2 Präzisionskontrolle Mikroliterverfahren

	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.,			
1. Ergebnis	132,8	1,89	1,4
2. Ergebnis	132,7	1,78	1,3
Moni-Trol II X, T. T.	120,69	1,86	1,52
Moni-Trol II X, T. T., P. korr.	117,05	1,40	1,19

2.3.5.2.1.3 Richtigkeitskontrolle Mikroliterverfahren

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.,				
1. Ergebnis	144,4	145,8	1,52	1,05
2. Ergebnis		145,8	1,56	1,07
Moni-Trol I, T. T.,	140	144,32	1,55	1,07

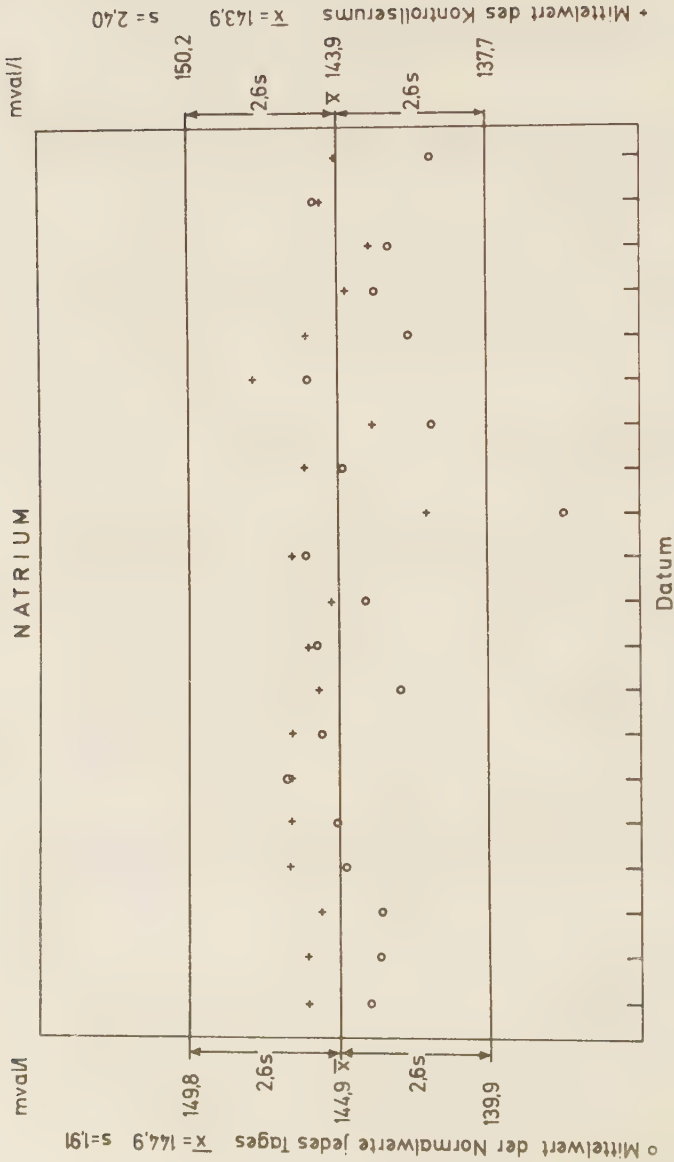


Abb. 12 : Qualitätskontrollkarte für Natrium im Serum. Kontrollperiode von 27. 4. bis 2. 6. 1970, Kontrollserum Moni-Trol I.

2.3.5.2.2 Kalium

2.3.5.2.2.1 Präzisionskontrolle Milliliterverfahren

	$\bar{x}$	s	VK%
1. Ringversuch, T. T.,			
1.Ergebnis	3,59	0,25	7,0
2.Ergebnis	3,52	0,06	1,7

2.3.5.2.2.2 Präzisionskontrolle Mikroliterverfahren

	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.,			
1.Ergebnis	5,42	0,17	3,1
2.Ergebnis	5,40	0,16	3,0
Moni-Trol II X, T. T.,	6,14	0,12	1,9
Moni-Trol II X, T. T., P. korr.	6,14	0,16	2,6

2.3.5.2.2.3 Richtigkeitskontrolle Mikroliterverfahren

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.,				
1.Ergebnis	4,81	4,77	0,15	3,1
2.Ergebnis		4,75	0,15	2,9
Moni-Trol I	4,3	4,37	0,11	2,5

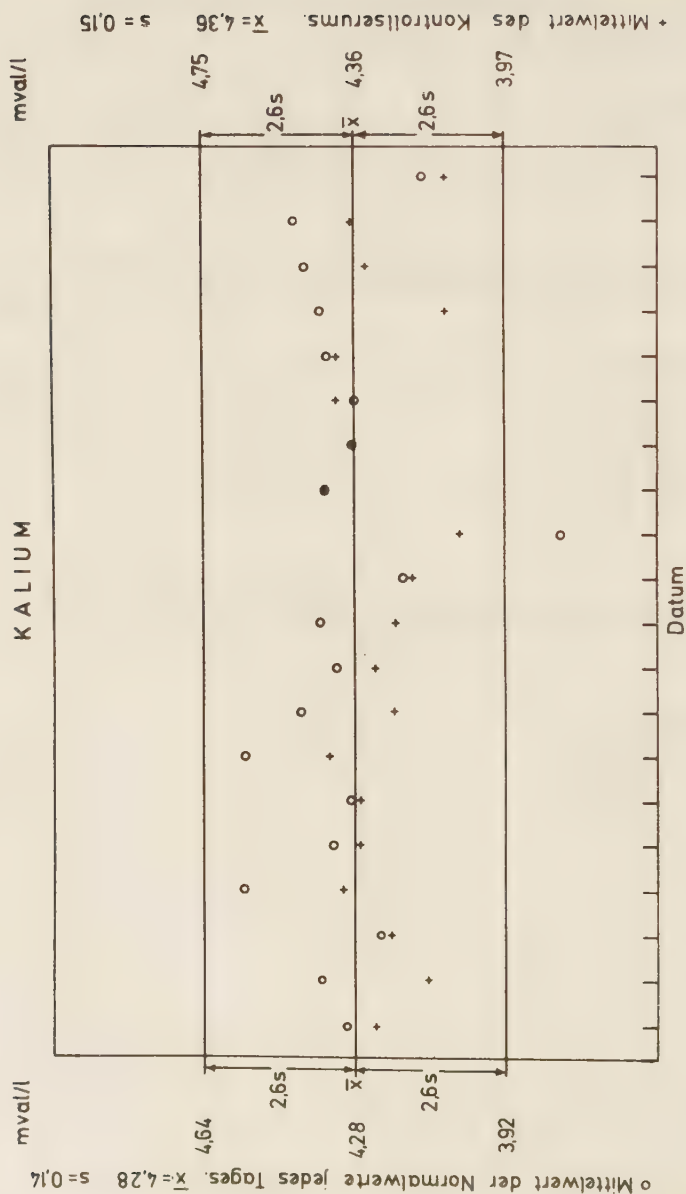


Abb. 13 : Qualitätskontrollkarte für Kalium im Serum für die Kontrollperiode von 27. 4. bis 2. 6. 1970. Kontrollserum Moni-Trol I.

2.3.5.2.3 Calcium

2.3.5.2.3.1 Präzisionskontrolle Milliliterverfahren

	$\bar{x}$	s	VK%
1. Ringversuch, T. T.,			
1.Ergebnis	4,64	0,35	7,5
2.Ergebnis	4,62	0,17	3,7

2.3.5.2.3.2 Präzisionskontrolle Mikroliterverfahren

	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.,			
1.Ergebnis	5,35	0,14	2,6
2.Ergebnis	5,35	0,16	3,0
Moni-Trol II X, T. T.,	4,0	0,13	3,2
Moni-Trol II X, T. T., P. korr.	4,26	0,07	1,6

2.3.5.2.3.3 Richtigkeitskontrolle Mikroliterverfahren

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.,				
1.Ergebnis	4,98	4,74	0,17	3,6
2.Ergebnis		4,74	0,20	4,2
Moni-Trol I	4,99	4,82	0,10	2,1

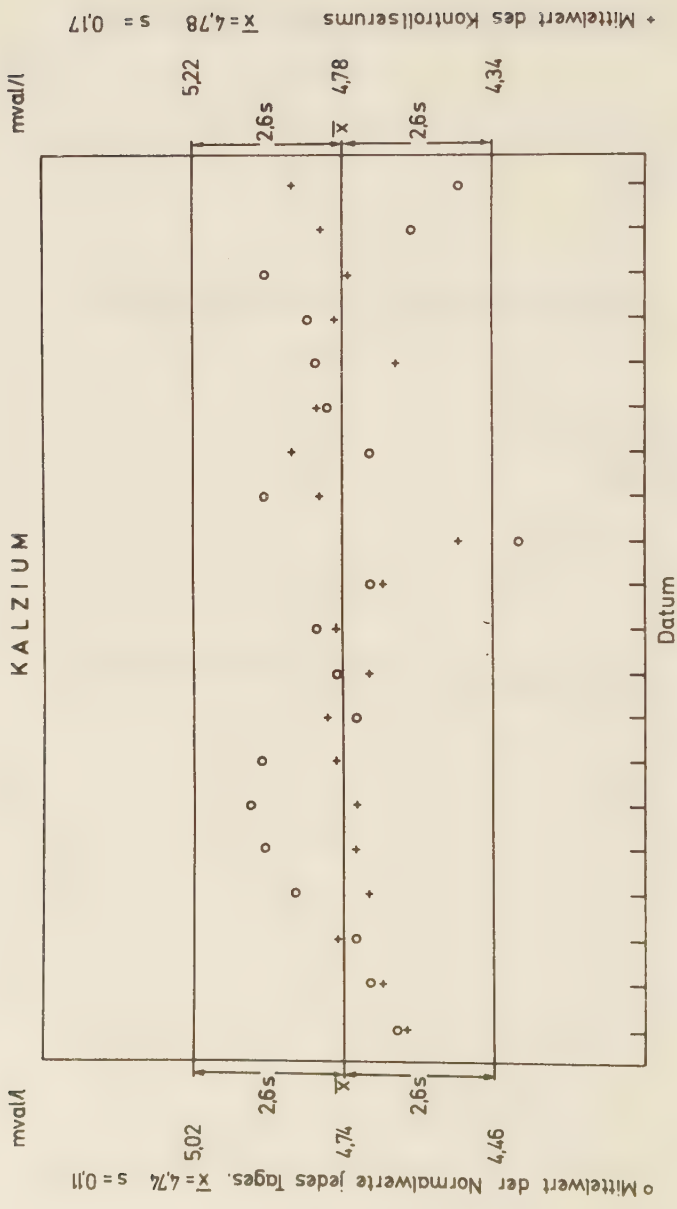


Abb. 14 : Qualitätskontrollkarte für Calcium im Serum der Kontrollperiode von 27. 4. bis 2. 6. 1970. Kontrollserum Moni-Trol I.

2.3.5.2.4 Bemerkungen

Das Serum für die Elektrolytbestimmung wurde bis Mai 1969 mit Vollpipetten pipettiert und in Meßkolben verdünnt. Das Arbeiten mit Mikroliterpipette und "Cipette" ist hier bei weitem rationeller, schneller und sparsamer. Der wunde Punkt der Elektrolytbestimmung ist die Eichung des Gerätes mit primärem Standard oder Kontrollserum. Obwohl die Verwendung von Lab-Trol gegenüber der früheren Verwendung einer Haupteichlösung (Merck Titrisol 9976) eine Verbesserung der Präzision brachte, bedeuten doch Pipettierfehler bei der Zubereitung einen systematischen Fehler, der die Werte eines ganzen Tages beeinflusst (siehe Abb. 12, 13, 14 der Kontrollkarten: Bezug von $\bar{N}$ zu Kontrollserum). In diesem Sinne bringt auch der Bezug der Präzisionskontrollprobe auf die Richtigkeitskontrolle (in unserem Fall zumindest bei Natrium und Calcium) eine Verbesserung der Präzision. Wie die Richtigkeitskontrolle zeigt, lagen die Ergebnisse bei Natrium im 2. Ringversuch um 1 %, bei der Kontrolle mit Moni-Trol I um 3 % zu hoch. Hier konnte ein systematischer Fehler entdeckt und beseitigt werden (vergl. Punkt 4 im " Traktat über den Umgang mit Mikroliterpipetten 'Marburg' "). Die Auswirkung eines schon fast groben Fehlers auf den Mittelwert der Normalwerte ($\bar{N}$) zeigt der 12. Tag der Kontrollperiode (siehe Abbildungen): Hier ist $\bar{N}$ bei allen drei Elektrolyten außer Kontrolle, obwohl der Kontrollwert noch keinen Anlaß zur Besorgnis gegeben hätte. Eine Verstellung des elektrischen Nullpunktes war nicht bemerkt worden. Dies führte zu einer Verzerrung der Meßbrücke. Dadurch stimmen zwar die Werte in der Nähe des Eichpunktes (z.B. Kontrollserum), je weiter sie jedoch von diesem nach unten entfernt sind, desto stärker weichen sie vom wahren Wert ab. Das macht sich bei $\bar{N}$ besonders bemerkbar.

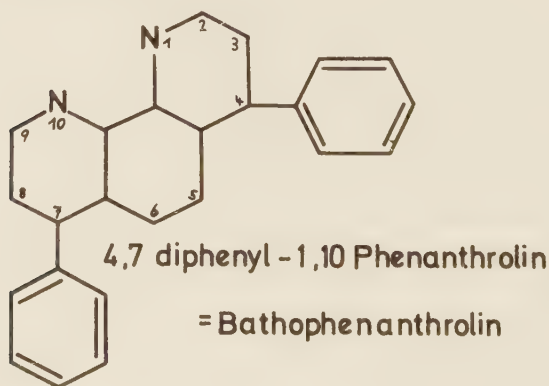
Bei Hyperproteinaemien und Hyperlipidaemien ist es angebracht, die in diesem Falle fälschlicherweise zu niedrigen Natriumwerte zu korrigieren. Genaue Angaben über das Verfahren finden sich bei W.H.WAUGH (161).

2.3.6 Bestimmung des Eisens im Serum

2.3.6.1 Milliliterverfahren - Eisen

2.3.6.1.1 Prinzip:

Das an Eiweiß locker gebundene Serumeisen wird durch die Behandlung des Serums mit Salzsäure von seiner Siderophilinbindung gelöst und in die ionisierte Form überführt. Nach dem Enteiweißen mit Trichloressigsäure erfolgt die Reduktion des dreiwertigen Eisens zur zweiwertigen Form durch Hydrochinon. Das zweiwertige Eisen bildet mit dem Eisenreagens Bathophenanthrolin in einer Metallchelatform einen roten Farbstoff, dessen Extinktion photometrisch gemessen wird.



2.3.6.1.2 Reagenzien:

- 1) Salzsäure 32 %ig (Merck p.a. 319)
oder Salzsäure 36 %ig (Merck p.a. 317)
- 2) Trichloressigsäure (Merck p.a. 807)
- 3) Hydrochinon (Merck 4610)
- 4) 4,7 Diphenyl - 1,10 Phenanthrolin (Merck p.a.1642)
- 5) n-Propanol

- 6) Ammoniaklösung 80 %ig, rein
- 7) Natriumacetat ($\text{CH}_3\text{COO Na} + 3 \text{H}_2\text{O}$; Merck p.a.6267)
- 8) Eisessig (Merck reinst DAB 6, 51)
- 9) Ferroammonsulfat ($\text{Fe SO}_4 (\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 + 6 \text{H}_2\text{O}$;
puriss.)

2.3.6.1.3 Herstellung der Lösungen:

- 1) 18 %ige Salzsäure: 270 ml 32 %ige Salzsäure (Merck p.a. 319) + 210 ml dest. Wasser oder 250 ml 36 %ige Salzsäure (Merck p.a. 317) + 250 ml dest. Wasser.
- 2) Trichloressigsäure 10 %ig: 50,0 g CCl_3COOH (Merck p.a. 807) mit bidest. Wasser ad 500 ml.
- 3) 4 %ige Hydrochinonlösung: 200 mg Hydrochinon (Merck 4610), die auf einem speziell gereinigten Uhrglas ausgewogen werden, werden in 5 ml bidest. Wasser kurz vor Gebrauch gelöst.
- 4) Eisenreagens: 120,0 mg 4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin (Summenformel $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{N}_2$) (Merck p.a.1642) in 650 ml n-Propanol (reinst,dest.) lösen und mit 200 ml Natriumacetat-Pufferlösung und 80 ml konz. Ammoniaklösung (rein) mischen.
- 5) Acetatpuffer: 125 g Natriumacetat ($\text{CH}_3\text{COO Na} + 3 \text{H}_2\text{O}$, Merck p.a. 6267) 120 ml Eisessig (Merck reinst, DAB 6, 51) mit bidest. Wasser ad 500 ml.

2.3.6.1.4 Vorbemerkung über die Reinigung der Glasgefäße:

Die Zentrifugenröhrchen werden zunächst mechanisch gesäubert und mit Wasser gespült. Über Nacht werden sie in Dichromatschwefelsäure eingelegt und am nächsten Morgen mit Leitungswasser und dann mit dest. Wasser gespült. Zum Trocknen werden sie mit Brennsgeist gespült und auf dem Trockengestell getrocknet. Die Pipetten werden im Pipettenreiniger kräftig mit Leitungswasser gespült und über Nacht in RBS 25-Lösung (Carl Roth OHG, Abteilung Chemie, Karlsruhe-West) eingelegt, anschließend mit Leitungswasser und

dann mit dest. Wasser gespült. Getrocknet werden sie im Trockenschrank bei 150° C. Sämtliche zur Eisenbestimmung verwendeten Geräte werden in geeigneten Glasgefäßen verschlossen aufbewahrt.

2.3.6.1.5 Arbeitsweise

2.3.6.1.5.1 Geräte

- a) 1-ml-Vollpipette (für Serum)
- b) 5-ml-Stabpipette (für Salzsäure
und Trichloressigsäure)
- c) Tropfpipette (für Hydrochinonlösung, darf in der
Serie nicht gewechselt werden)
- d) 2-ml-Vollpipette (für Überstand)
- e) 10-ml-Stabpipette (für Eisenreagens)
20-mm-Küvette und Photometer Eppendorf

2.3.6.1.5.2 Pipettierschema

Jeder Analysenwert wird doppelt ausgeführt, es werden drei Leerwerte angesetzt.

In Zentrifugenröhrchen pipettieren			
	Analyse	Blindprobe	Geräte
Serum	1,0 ml	--	a
dest. Wasser	--	1,0 ml	a
Salzsäure	0,5 ml	0,5 ml	b
sorgfältig mischen durch vorsichtiges Klopfen des Röhrchens auf eine geeignete Unterlage, 20 min bei Zimmertemperatur stehenlassen			
Trichloressigsäure	1,5 ml	1,5 ml	b
mischen wie oben, 10 min stehenlassen und dann 20 min bei 2200 x g zentrifugieren			

	Analyse	Blindprobe	Geräte
völlig klaren Überstand	2,0 ml	2,0 ml	d
Hydrochinonlösung	2 Tropfen	2 Tropfen	c
Eisenreagens	2,5 ml	2,5 ml	e

mischen wie oben und mindestens 20 min bei Zimmertemperatur stehenlassen. Extinktionsmessung im Photometer Eppendorf in einer 20-mm-Küvette mit Filter 546 nm. Der Nullpunkt wird auf dest. Wasser eingestellt. Die Extinktion der Blindprobe wird von der Extinktion des Analysenwertes abgezogen.

2.3.6.1.6 Berechnung:

Die Konzentration des Eisens im Serum erhält man nach einer selbst erstellten Eichkurve, nach der einer Konzentration von 100 % Eisen in 100 ml Serum eine Extinktion von 0,1 entspricht. Bei der Erstellung der Eichkurve war die Extinktion der Blindprobe 0,06.

2.3.6.1.7 Eichung:

- 1) Eisenstammlösung für die Eichkurve (bei Bedarf frisch zubereiten): 105 mg Ferroammonsulfat ($\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 6 \text{H}_2\text{O}$, puriss.) werden analytisch gewogen und in einem 500-ml-Meßkolben mit bidest. Wasser gelöst und zur Marke aufgefüllt. Die Lösung enthält 3000 µg pro 100 ml Eisen.
- 2) Eisenstandardlösung 100 µg/100 ml: 2,0 ml Stammlösung werden mit einer Vollpipette in einen 60-ml-Meßkolben pipettiert und mit bidest. Wasser aufgefüllt.
 - Analog stellt man sich eine Verdünnung mit 200 und 300 µg% Eisen her und setzt sie in obigen Analysengang ein.

Literatur: siehe bei Mikroliterverfahren.

2.3.6.2 Mikroliterverfahren - Eisen*

2.3.6.2.1 Prinzip:

Die Eiweißbestandteile des Serums bleiben in einem schwach sauren Phosphatpuffer in Lösung, während das an das Protein Transferrin (Siderophilin) gebundene Eisen vom Eiweiß abgespalten wird. Nach Reduktion mit Natriumascorbat wird das Eisen mit einem spezifischen Eisenreagens (sulfoniertes Bathophenanthrolin) in eine rotgefärbte Verbindung überführt, deren Extinktion bei Hg 546 nm in der 10-mm-Mikroabsaugküvette gemessen wird.

2.3.6.2.2 Reagenzien:

Merckotest-Reagenziensatz "Eisen" (Art.-Nr. 3307) enthält alle Reagenzien für die hier beschriebene Bestimmung in gebrauchsfertiger Form.

- 1) Puffer (0,4 M Natriumphosphat-Puffer pH 5,5)
- 2) Farbreagens ($6,8 \cdot 10^{-4}$ M Bathophenanthrolindisulfonsäure Dinatriumsalz, 0,4 M Natriumphosphat-Puffer pH 5,5)
- 3) Natriumascorbat
- 4) Eisen-Standardlösung (1,0 µg/ml)

Alle Reagenzien sind gebrauchsfertig. Verschlossen aufbewahrt sind sie bei Raumtemperatur über ein Jahr haltbar (nach Angabe der Firma).

2.3.6.2.3 Arbeitsweise:

In drei trockene Reaktionsgefäße (Anmerkung 1) eintragen bzw. pipettieren:

*) Nach Eppendorf-Firmendruckschrift zum Mikrolitersystem.

	Serum- blindprobe	Analyse	Reagenzien- blindprobe	Standard- probe
Natriumascorbat (Anmerkung 1)	ca.2 mg	ca.2 mg	ca.2 mg	2 mg
Puffer	200/ul	--	--	--
Farbreagens	--	200/ul	200/ul	200/ul
bidest. Wasser	--	--	200/ul	--
Serum (Anmerkung 3)	200/ul	200/ul	--	--
Standard	--	--	--	200/ul

Man mischt 30 sec, erhitzt im Thermostaten 20 min bei 37° C. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur werden die Extinktionen der Analyse und der Serumblindprobe in der 10-mm-Mikroabsaugküvette bei Hg 546 nm gegen die Reagenzienblindprobe gemessen (Anmerkung 3).

2.3.6.2.4 Berechnung:

$$\frac{E_A - E_B}{E_S} \times 100 = \mu\text{g Eisen}/100 \text{ ml Serum}$$

E_A = Extinktion der Analyse

E_B = Extinktion der Serumblindprobe

E_S = Extinktion der Standardprobe

Normalbereich: Männer 90 - 175/ug Eisen/100 ml Serum
Frauen 75 - 120/ug Eisen/100 ml Serum

2.3.6.2.5 Anmerkungen:

- 1) Die Spatelspitze eines kleinen Mikrospatels entspricht ungefähr 3 mg Na-Ascorbat. Ein Überschuß

stört die Reaktion nicht.

- 2) Das Serum muß frisch zentrifugiert und vollkommen klar sein.
- 3) Die Extinktion der Reagenzienblindprobe, gemessen gegen dest. Wasser, sollte nicht höher als 0,03 liegen, da sonst die Bestimmung niedriger Eisengehalte zu unsicher wird. Liegt die Reagenzienblindprobe höher, so sind die Reagenzien zu erneuern oder die Reaktionsgefäße mit verdünnter Salpetersäure zu reinigen. Besondere Sorgfalt ist auch auf die Qualität des verwendeten bidest. Wassers zu legen, das möglichst aus einer Quarzapparatur stammen und nur in Kunststoff-Flaschen aufbewahrt werden sollte.

2.3.6.2.6 Literatur: 31, 45, 53, 127, 142, 166.

2.3.6.3 Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Eisenanalyse

2.3.6.3.1 Präzisionskontrolle des Milliliterverfahrens

	$\bar{x}$	s	VK%
1. Ringversuch, T. T.,			
1. Ergebnis	90,91	2,79	3,1
2. Ergebnis	91,48	2,82	3,1

2.3.6.3.2 Präzisionskontrolle Mikroliterverfahren

	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.,			
1. Ergebnis	101,3	3,15	3,1
2. Ergebnis	101,9	3,61	3,5

2.3.6.3.3 Richtigkeitskontrolle Mikroliterverfahren

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.,				
1. Ergebnis	114,2	112,6	4,7	4,2
2. Ergebnis		112,3	4,1	3,7

2.3.6.3.4 Bemerkung:

Obwohl die Mikrolitermethode ohne Enteiweißung arbeitet, können die Ergebnisse als zufriedenstellend bezeichnet werden. Gegen den angegebenen Sollwert der Richtigkeitskontrollprobe des 2. Ringversuches von 114,2 steht der Mittelwert aller 23 beteiligten Labors in Deutschland (persönliche Mitteilung von D.STAMM an die Teilnehmer) von 112,3 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Serum. Die Moni-Trols eignen sich wegen der leichten Trübung (Lipide ?), die bei der Rekonstitutionierung entsteht, nicht zur Kontrolle dieser Methode. Hier muß mit einem flüssigen Kontrollserum gearbeitet werden (z.B. Lab-Trol, Fa. Dade).

2.3.7 Veresterte Fettsäuren im Serum

2.3.7.1 Prinzip:

Die Fettsäuren werden extrahiert und mit Hydroxy-
lamin in alkalischer Lösung umgesetzt. Dabei bilden sich
in quantitativer Reaktion die entsprechenden Hydroxam-
säuren, die mit einer Eisensalzlösung eine rotbraune
Farbe geben. Die Intensität dieser Farbe ist der Zahl
der Esterbindungen proportional. Ein Trioleinstandard
bildet die Bezugsgröße für die Zahl der Esterbindungen.

2.3.7.2 Reagenzien:

(Testpackung der Firma Haury, Chemische Fabrik,
München 23)

- 1) Hydroxylaminhydrochloridlösung 11 %ig (550 g in
230 ml Wasser lösen und mit Methanol auf 5,0 l
auffüllen).
- 2) Eisen-(III)-Chloridlösung 10 %ig in 0,1 N HCl
- 3) Trioleinstandard 50 mg%
- 4) Natronlauge 10 %ig (10 g Na OH ad 100 ml mit
dest. Wasser auffüllen)
- 5) Isopropanol, wasserfrei
- 6) mindestens 4,6 N HCl : 38 ml konz. H Cl (36 - 37%)
mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen.
- 7) Diaethylaether

Die Haltbarkeit der Reagenzien ist bei Zimmertempera-
tur unbegrenzt (nach Angabe der Firma).

2.3.7.3 Arbeitsweise:

- | | |
|------------------|-----------------------------|
| 1) <u>Geräte</u> | a) 2-ml-ADH-Stabpipette |
| | b) 0,1-ml-Blutzuckerpipette |
| | c) 1-ml-ADH-Stabpipette |

2. Pipettierschema:

	Analyse	Standard	Blindprobe	Geräte
Isopropylalkohol	1,9 ml	--	--	a
Serum	0,1 ml	--	--	b
Serumpipette durch Ausblasen und Aufsaugen der Mischung mehrmals durchspülen. Gut schütteln und 10 min stehenlassen, dann 10 min bei 2200 x g zentrifugieren. In neue Reagenzgläser wird pipettiert:				
10 %ige Natronlauge	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	c
Hydroxylaminlösung	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	c
Überstand ($\hat{=}$ 0,05 ml Serum)	1,0 ml	--	--	c
Standard	--	1,0 ml	--	c
Isopropylalkohol	--	--	1,0 ml	c
gut mischen und 30 min bei Zimmertemperatur stehenlassen				
4,6 N HCl	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	c
Eisen-(III)- Chloridlösung	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	c
Diaethylaether	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	c
gut mischen und nach 20 min bei 546 nm im Photometer Eppendorf in einer 10-mm-Küvette die Extinktion von Analyse und Standard gegen die Blindprobe ablesen.				

2.3.7.4 Berechnung:

$$\frac{E_{\text{Analyse}}}{E_{\text{Standard}}} \times 1000 = \text{mg\% veresterte Fettsäuren bezogen auf Triolein}$$

Normalwerte:

Frauen bis 380 mg/100 ml Serum $\hat{=}$ 12,9 mval/l

Männer bis 430 mg/100 ml Serum $\hat{=}$ 14,9 mval/l

2.3.7.5 Literatur: 65, 66, 81, 131, 139.

Qualitätskontrolle s. 2.3.8.9

2.3.8 Die Bestimmung der β -Lipoproteide*

2.3.8.1 Prinzip:

Die β -Lipoproteine werden bei Anwesenheit von Calcium und Heparin ausgefällt. Die dabei durch Chylomikronen entstehende Trübung wird bei 691 nm gemessen.

2.3.8.2 Reagenzien:

- a) Calciumchloridlösung 0,025 M der Fa. Behring Werke. Gebrauchsfertig.
- b) Heparinlösung, 1 %ig: Eine Ampulle mit etwa einem Milliliter Liquemin (entsprechend 2500 USP-Einheiten Heparin, ca. 25 mg) der Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach/Baden, wird mit der Ampullensäge eröffnet. Man entnimmt vorsichtig zweimal 500 μ l und pipettiert in ein Polystyrolgefäß. Dazu fügt man 1500 μ l bidest. Wasser und mischt gründlich.
- c) β -Lipoprotein-Gebrauchslösung:
Für je 25 Bestimmungen:
Calciumchloridlösung 0,025 M 25,0 ml
Heparinlösung 1 %ig 0,5 ml.
Die Lösung ist gründlich zu mischen. Sie darf nur täglich frisch unmittelbar vor Gebrauch angesetzt werden.

*) Nach WEBER/WEGMANN (162)

2.3.8.3 Arbeitsweise:

Es sollen nie mehr als 12 Proben angesetzt werden, da die Trübung stark zeitabhängig ist !

	Analyse	Blindprobe (nur bei sehr trübem Serum)
Serum	50/ul	50/ul
B-Lipoprot. Gebrauchslösung	1000/ul	--
Ca Cl ₂ Lösung	--	1000/ul

Jede Probe wird sofort zweimal umgeschüttelt und bei 25⁰ C in den Thermostaten gestellt. Man temperiert exakt 5 min, gerechnet unmittelbar ab Zugabe der Gebrauchslösung zur ersten Probe . Nach Ablauf der Zeit überführt man nach nochmaligem Schütteln mit einer 1000/ul-Pipette knapp 1000/ul der Probe in eine auf genau 25⁰ C temperierte Halbmikroküvette (temperierter Küvettenhalter). Man liest die Extinktion gegen dest. Wasser (bei sehr trübem Serum gegen die Blindprobe) bei 691 nm in einem mit Photomultiplier ausgerüsteten Photometer Eppendorf ab. Der Inhalt der Küvette wird mit Wasserstrahlpumpe und dünnem PVC-Schlauch durch die Bohrung in der Küvettenwand abgesaugt.

ACHTUNG! : Außer der Halbmikroküvette ist auch noch der Halbmikrotubus A 2,5 x 8 zu verwenden.

2.3.8.4 Berechnung:

In Ermangelung einer geeigneten Standardisierung der Methode gibt man das Ergebnis in E (Extinktion) an.

2.3.8.5 Normalbereich: E = 0,200 - 0,450

Dieser Normalbereich gilt nur für ein bestimmtes Photometer, für diese Arbeitsweise (Zeit, Temperatur) und für eine bestimmte Küvettenposition.

2.3.8.6 Anmerkung:

Die Bestimmung der β -Lipoproteide ist außerordentlich einfach und eignet sich daher besonders als Screening-Methode (1). Da die β -Lipoproteide als Träger für die meisten Fettfraktionen dienen, sind mit ihrer Bestimmung fast alle Hyperlipidaemien zu erfassen und einer spezielleren Analyse durch das Fettstoffwechsellabor zuzuführen.

2.3.8.7 Literatur: 153, 162.

2.3.8.8 Qualitätskontrolle und Bemerkungen

Die Qualität der Bestimmung der veresterten Fettsäuren wurde nur einmal im Rahmen der Präzisionskontrolle mit Schweineserum errechnet. Es ergaben sich folgende Werte: $\bar{x}$ = 160,4 mg/100 ml ; s = 22,9 ; VK = 14 %.

Die auch von seiten der Klinik angezweifelte Genauigkeit der Methode war zusammen mit ihrer zeitraubenden und aufwendigen Durchführung der Grund, eine einfachere, für die Belange eines Routinelaboratoriums ausreichende Methode zu suchen, mit der es möglich ist, Hyperlipidaemien auch ohne Hypercholesterinaemie zu erkennen. Wir fanden sie in der Bestimmung der β -Lipoproteide nach WEBER und WEGMANN. Von diesem Verfahren, das erst seit kurzer Zeit in die Routine eingeführt ist, liegen noch keine Kontrollergebnisse vor. Ein eigener Normalbereich wurde erstellt.

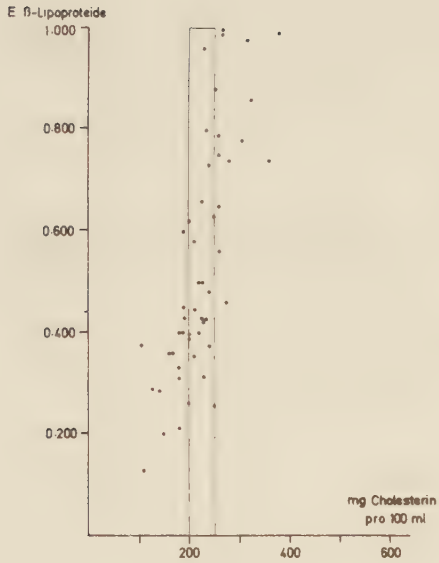


Abb. 15 : Die Beziehung zwischen Cholesterin-Spiegel und β -Lipoprotein-Spiegel bei 51 Patienten zur Überprüfung des Normalbereiches der β -Lipoproteide.

2.4 Methoden, an denen nichts geändert wurde

2.4.1.1 Die Bestimmung des Serumeiweißes mit dem ABBÉ - Refraktometer

2.4.1.1.1 Prinzip:

Die Brechzahl des Serums wird hauptsächlich durch seinen Eiweißgehalt bestimmt. Das Refraktometer erlaubt eine genaue Messung der Brechzahl. Die Eiweißkonzentration läßt sich aus einer Tabelle entnehmen.

2.4.1.1.2 Arbeitsweise:

Für die Untersuchung werden wenige Tropfen der Probe auf die blanke Fläche des Meßprismas gebracht. Das Beleuchtungsprisma wird angeklappt und das Refraktometer mit seinen Lichteintrittsöffnungen gegen das Fenster oder eine künstliche Lichtquelle gerichtet. Dabei tritt das Licht bei angeklapptem Spiegel und hochgeschlagenem Verschuß in das Beleuchtungsprisma ein, durchsetzt die dünne Schicht der aufgetragenen Flüssigkeit und gelangt vom Meßprisma durch ein Objektiv zur Abbildung der Grenzlinie in das obere Blickfeld des Okulars. Durch Drehen der Mikrometerschraube bewegt man einen Spiegel, der diese Grenzlinie, die sich als Hell-Dunkel-Grenze darstellt, von unten her in die Mitte des Blickfeldes verschiebt. Der farbige Saum zwischen Dunkel und Hell wird durch Drehen am Kompensator-knopf beseitigt, so daß die Grenzlinie farblos und scharf erscheint. Dann wird durch weiteres Drehen der Mikrometerschraube die Grenzlinie genau in die Mitte des Fadenkreuzes eingestellt. Für diese Einstellung gibt im unteren Blickfeld der senkrecht durch die Mitte der Skalen verlaufende Strich die Brechzahl der Probe an.

2.4.1.1.3 Berechnung:

Die Eiweißkonzentration in g/100 ml Serum wird einer Tabelle entnommen, in der die Brechzahl gegen die Serumeiweißkonzentration aufgetragen ist.

Normalwerte: 6 - 8 g/100 ml Serum

2.4.1.1.4 Eichung:

Die Eichtablelle wird mit Hilfe der Biuretmethode durch Verarbeitung einer möglichst großen Anzahl von Seren erstellt. Es sollen mit beiden Methoden Doppelwerte bestimmt werden.

2.4.1.1.5 Literatur: 35, 106.

2.4.1.2 Eiweiß in Serum und Liquor - Biuret-Methode

2.4.1.2.1 Prinzip:

Für die Bestimmung des Gesamteiweißes im Serum stehen eine Vielzahl physikalischer (Bestimmung des spezifischen Gewichts, Refraktometrie, UV-Spektrophotometrie) und chemischer Methoden (KJELDAHL-, Ninhydrin- und FOLIN-LOWRY-Methode) zur Verfügung. Die Biuretmethode ist allen diesen Techniken überlegen, da keine besondere Einrichtung benötigt wird, die Spezifität hoch und der Arbeitsaufwand gering ist. Sie wurde aus diesen Gründen auch in die " Standard Methods of Clinical Chemistry " der " American Association of Clinical Chemists " aufgenommen.

Stoffe mit mindestens 2 Peptidbindungen



geben mit Kupfersalzen in alkalischer Lösung eine Violett-färbung. Die einfachste Verbindung, die eine positive Reaktion gibt, ist das Biuret, das durch Erhitzen von Harnstoff hergestellt werden kann. Die Biuret-Reaktion ist spezifisch auf Peptide und Proteine. Sie gibt negative Resultate mit Ammoniak, Harnstoff, Aminosäuren und anderen

einfachen N-haltigen Verbindungen. Mit Eiweißen liegt das Extinktions-Maximum bei 546 nm, bei Peptiden mehr gegen das kurzwellige Licht verschoben. Verschiedene Eiweiße unterscheiden sich kaum durch ihre Maxima und Extinktionskoeffizienten. Die Biuret-Reaktion gibt daher auch bei stark pathologischen Seren unverfälschte Werte. Die Farb-Intensität ist der Zahl der Peptid-Bindungen über einen weiten Meß-Bereich direkt proportional, die Forderung des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes somit erfüllt.

2.4.1.2.2 Reagenzien:

Merckotest Reagenzienpackung " Gesamteiweiß (Biuretmethode) " Art.Nr. 3327, Merck, Darmstadt

- 1) Biuretreagens-Konzentrat
- 2) Vergleichsreagens-Konzentrat
- 3) Standard (6 g% Eiweiß)

2.4.1.2.3 Herstellung der Lösungen:

- 1). Biuret-Reagens: 0,018 M K-Na-Tartrat, 0,01 M KJ
0,012 M CuSO_4 , 0,2 M NaOH

Inhalt einer Flasche (1) mit bidest. Wasser auf 500 ml auffüllen. Gegebenenfalls filtrieren.
(Gut verschlossen bei Raumtemperatur ein Jahr haltbar)(Angabe der Firma).

- 2) Vergleichsreagens:

0,018 M K-Na-Tartrat, 0,2 M NaOH

Inhalt von Flasche (2) mit bidest. Wasser auf 500 ml auffüllen. (Gut verschlossen bei Raumtemperatur ein Jahr haltbar)(Angabe der Firma).

2.4.1.2.4 Ausführung *

Eine Blindprobe braucht nur bei hämolytischen, ikterischen und trüben Seren mitgeführt zu werden.

Für jede Analysenserie wird nur eine Standardprobe angesetzt. Wenn die Extinktion der Standardprobe bei den verschiedenen Analysenserien genügend gut reproduziert werden kann, darf auf weitere Standardproben verzichtet werden.

In Reagenzgläser einpipettieren:

	Analyse	Blindprobe
Serum oder Plasma (gegebenenfalls Standard (3))	20/ul	20/ul
Biuret-Reagens (1)	1000/ul	--
Vergleichsreagens (2)	--	1000/ul
mischen, eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur stehenlassen. Extinktionen der Analysen- und gegebenenfalls der Standardproben gegen das Biuret-Reagens (1), die Extinktion der Blindproben gegen Wasser messen.		

Extinktionsmaximum: 545 nm

Filter : Hg 546

Schichtdicke: 1 cm

2.4.1.2.5 Berechnung

a) Bei Verwendung des Standards:

$$\frac{E_A - E_{AB}}{E_S - E_{SB}} \times 6 = \text{g Eiweiß/100 ml Serum}$$

oder einfacher:

$$b) (E_A - E_{AB}) \times 19 = \text{g Eiweiß/100 ml Serum}$$

*) Nach " Gesamteiweiß-Biuretmethode - Merckotest ",
Fa. E. Merck, Darmstadt.

- E_A = Extinktion der Analysenprobe
 E_S = Extinktion der Standardprobe
 E_{AB} = Extinktion der Analysenblindprobe (kann bei Seren, bei denen kein Blindwert erforderlich war, gleich 0,010 gesetzt werden)
 E_{SB} = Extinktion der Standard-Blindprobe (kann gleich 0,010 gesetzt werden)

2.4.1.2.6 Eichung:

10 g Rindereiweiß (Fa. Fluka 05480) werden in 100 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Durch Pipettieren stellt man sich Verdünnungen von 4,0 - 4,5 - 5,0 - 5,5 usw. bis 9,0 g Eiweiß/100 ml physiolog. Kochsalzlösung her. Mit den einzelnen Proben führt man Doppelbestimmungen nach dem obigen Analysengang aus. Die Extinktionswerte müssen sich, in ein geeignetes Koordinatensystem gegen die Konzentration als Abszisse aufgetragen, zwanglos durch eine Gerade verbinden lassen.

Normalbereich:

Erwachsene und Kinder ab drei Jahren:

6,2 - 8,5 g/100 ml Serum

Kinder unter drei Jahren:

5,4 - 8,5 g/100 ml Serum

2.4.1.2.7 Anmerkungen

- 1) Mit der Biuret-Methode kann auch der Eiweißgehalt von vielen anderen Proben bestimmt werden (z.B. Urin).
Z.B. löst man zur Analyse von Trichloressigsäure-Präzipitaten den Niederschlag, der 2 - 20 mg Protein enthalten soll, in 0,5 ml 3 %iger Natronlauge und gibt 5 ml Biuret-Reagens-Lösung (1) hinzu. Nach einer halben Stunde mißt man die Ex-

tinktion bei 546 nm gegen einen Blindwert aus 5 ml Biuret-Reagens-Lösung (1) und 0,5 ml Wasser.

Zur Eichung kann hierbei der Serum-Standard oft nur näherungsweise verwendet werden. Für genaue Messungen empfiehlt es sich, einmal mit dem betreffenden Eiweiß den Umrechnungsfaktor von KJELDAHL-Eiweißwert (getrennt bestimmt nach 4) in Extinktion nach der Biuret-Methode zu ermitteln. Dieser Umrechnungsfaktor tritt an die Stelle des umstehenden Faktors 19. Steht dieser Berechnungsfaktor nicht zur Verfügung, kann näherungsweise mit folgender Formel gerechnet werden:

$$\text{Eiweißgehalt} = E_A \cdot 20 \text{ mg/Ansatz}$$

$$E_A = \text{Extinktion der Analyse}$$

- 2) Zur Eiweiß-Bestimmung in der Cerebrospinal-Flüssigkeit verwendet man das Biuret-Reagens-Konzentrat ohne vorherige Verdünnung. Man vermischt 500 μ l Cerebrospinal-Flüssigkeit mit 50 μ l Biuret-Reagens-Konzentrat, läßt eine halbe Stunde lang stehen und zentrifugiert gegebenenfalls. Anschließend wird die Extinktion des Überstandes gegen einen Blindwert aus 2 ml Wasser und 0,2 ml Biuret-Reagens-Konzentrat bei 546 nm gemessen.

$$\text{Eiweißgehalt} = E \cdot 400 \text{ mg/100 ml}$$

Normalbereich: 5 - 45 mg Eiweiß pro 100 ml Cerebrospinal-Flüssigkeit.

- 3) Bei der Analyse von Präzipitaten muß man beachten, daß große Mengen Ammoniumsalze die Biuret-Reaktion stören.
- 4) Serum bzw. Plasma von Patienten, die größere Mengen Polydextrane intravenös erhalten haben, liefert nach der Biuret-Methode zu hohe Eiweißwerte. In diesem Fall sollte der Eiweißgehalt nach der KJELDAHL-Methode bestimmt werden.

2.4.1.2.8 Literatur: 94, 106, 112, 126, 151.

2.4.1.3 Qualitätskontrolle der Gesamteiweißbestimmung

2.4.1.3.1 Präzisionskontrolle

	$\bar{x}$	s	VK%
1. Ringversuch, T. T.,			
1.Ergebnis	6,45	0,17	2,6
2.Ergebnis	6,29	0,10	1,6
Schweineserum, T. T.	7,06	0,56	8
2. Ringversuch, T. T.,			
1.Ergebnis	6,32	0,23	3,6
2.Ergebnis	6,32	0,23	3,6
Moni-Trol II X, T. T.	5,15	0,10	1,9
Moni-Trol II X, T. T., P. korr.	5,15	0,15	2,9

2.4.1.3.2 Richtigkeitskontrolle

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.,				
1.Ergebnis	6,93	6,76	0,20	2,9
2.Ergebnis		6,74	0,19	2,8
Moni-Trol I, T. T.	7,05	7,05	0,16	2,3

2.4.1.3.3 Bemerkungen:

Die Verwendung des ABBÉ-Refraktometers (Carl Zeiss, Oberkochen,) für die Gesamteiweißbestimmung im Serum hat sich zweifellos bewährt. Verglichen mit der unkomplizierten und raschen Durchführung der Messungen sind die Ergebnisse in Präzision und Richtigkeit voll zufriedenstellend. Allerdings zeigt sich auch hier, daß eine Qualitätskontrolle mit Poolserum durchaus ihre Tücken haben kann: Die mit diesem Verfahren ermittelte Präzision ist weitaus geringer

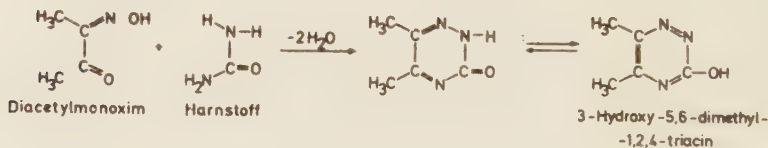
als jede andere der mit käuflichen Kontrollseren gewonnenen Präzisionen (Haltbarkeit?). Weiterhin soll die Kontrolle von $\bar{N}$ noch für die Refraktometrie zur Erkennung systematischer Fehler eingeführt werden.

Die Biuret-Methode wird nicht routinemäßig durchgeführt und unterliegt daher keiner Qualitätskontrolle.

2.4.2.1 Die Bestimmung von Harnstoff-Stickstoff im "Technicon"-Autoanalyser

2.4.2.1.1 Prinzip:

Das Verfahren ist eine Abwandlung der Carbamido-diacetyl-Reaktion zur Bestimmung von Harnstoff-Stickstoff. Es beruht auf der direkten Reaktion von Harnstoff mit Diacetylmonoxim (2,3- Butadion-2-oxim) unter stark sauren Bedingungen. In saurer Lösung kondensiert Diacetylmonoxim mit Harnstoff unter Abspaltung von 2 Mol Wasser in Anwesenheit einer sauren Eisenalaunlösung zu einer heterozyklischen Verbindung, die zum Triazinderivat enolisiert. Das gefärbte Reaktionsprodukt wird bei 480 nm in einer 15 mm Zylinderdurchflußküvette gemessen.



2.4.2.1.2 Reagenzien:

- 1) Saures Eisen-(III)-Reagens: In einen 2-l-Erlenmeyerkolben, der 500 ml dest. Wasser enthält, werden 5,0 g Eisen-(III)-Alaun ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) gegeben und bis zur Lösung durchgemischt. Der Kolben wird dann in Eiswasser gestellt und 500 ml Ortho-Phosphorsäure (konz. 85 %ig p.a.) dem Inhalt zugefügt, wobei man gut durchmischt. Unter weiterem Mischen in Eiswasser werden jetzt vorsichtig 500 ml konz. Schwefelsäure (Dichte 1,84) zugegeben. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur füllt man in eine dunkle Flasche ab und signiert.
- 2) Diacetylmonoxim-Lösung: 5,0 g Diacetylmonoxim werden in einen 1-l-Meßkolben gebracht, etwa 500 ml dest. Wasser hinzugefügt und bis zur voll-

ständigen Lösung geschüttelt. Nach Zugabe von 150 g Natriumchlorid und weiteren Wassers wird auch hier bis zur Lösung gemischt. Nach Auffüllen bis zur Marke mit dest. Wasser und Filtrieren wird die Lösung in eine dunkle Flasche abgefüllt und signiert. (Datum!)

- 3) Diacetylmonoxim-Harnstoff-Lösung: 10 ml der 100 mg%igen Harnstoffgebrauchsverdünnung (siehe unten) werden in einen 1-l-Meßkolben gegeben und mit der Diacetylmonoximlösung auf einen Liter aufgefüllt. Nach Abfüllen in eine dunkle Flasche mit Datum signieren und 0,5 ml Brij-35 (Netzmittel) zugeben und mischen.

NB: Diese Lösung wird als Aufnahmestrom verwendet und ist höchstens eine Woche haltbar.

- 4) Physiologische Kochsalzlösung: 9 g Natriumchlorid werden in einem 1-l-Meßkolben mit 500 ml dest. Wasser bis zur vollständigen Lösung geschüttelt. Anschließend füllt man bis zur Marke auf, fügt 0,5 ml Brij-35 hinzu und mischt gut durch.

2.4.2.1.3 Arbeitshinweise:

- 1) Es können 60 Bestimmungen in der Stunde durchgeführt werden.
- 2) Zur Erreichung einer optimalen Blasenfolge und eines niedrigen Geräuschpegels sind der Salzlösung sowie der Diacetylmonoximlösung-Harnstofflösung 0,5 ml Netzmittel zugefügt.
- 3) Die Zugabe von Harnstoff zur Diacetylmonoximlösung ermöglicht das Erreichen einer linearen Eichkurve und erhöht die Empfindlichkeit bei niedrigen Harnstoffgehalten. Verglichen mit Wasser liegt die Reagenziengrundlinie sehr niedrig (in Richtung 0 % Transmission). Die Grundlinie läßt sich bei Verwendung einer geeigneten Lochblende im Kolorimeter (Vergleichsseite) mit dem 100 % T-Abgleich auf

98 % T einstellen, wobei alle Reagenzien durch ihre entsprechenden Leitungen gepumpt werden.

- 4) Das Schlauchsystem ist mit Stoßausgleichskammern versehen, Leitungsverengungen, die zwischen den Pumpenschläuchen und dem übrigen Schlauchsystem eingebaut sind. Diese gewährleisten ausgeglichene Strömungsverhältnisse für Luft und Reagenzien, wodurch die Blasenfolge optimal und der Geräuschpegel niedrig gehalten werden.
- Vorsicht: Zur Einstellung der Reagenziengrundlinie darf nie der Schnellgang der Pumpe eingeschaltet werden, da hierbei die Gefahr besteht, daß Säure aus dem Pumpenschlauch spritzt. Zum Nachspülen des Schlauchsystems darf der Schnellgang erst eingeschaltet werden, nachdem die Reagenzien die Schlauchverengungen durchlaufen haben. So lange ist mit normaler Geschwindigkeit zu spülen.

2.4.2.1.4 Arbeitsweise siehe Fließschema Abb. 16.

2.4.2.1.5 Berechnung:

Die Gipfelpunkte der einzelnen "peaks" der Eichtrappe (siehe unten) werden vom Schreiberpapier auf eine mitgelieferte durchsichtige Schablone als Ordinatenpunkte gegen die entsprechenden Konzentrationswerte als Abszisse durchgezeichnet. Da die Kurve nicht linear verläuft, werden die Meßpunkte mit einem Kurvenlineal in der üblichen Weise verbunden. Mit dieser durchsichtigen Schablone werden die einzelnen "peaks" der Patientenserum auf dem Schreiberpapier abgefahren. Die Konzentrationen lassen sich dann direkt in mg Harnstoff-N/100 ml Serum ablesen.

2.4.2.1.6 Eichung:

- 1) Verdünnungsmittel für die Eichlösung: 0,2 g Phenylquecksilberacetat (PMA) werden in ein 250-ml-Becherglas gegeben, 100 ml dest. Wasser zugefügt

TECHNICON AUTOANALYSER FLIEßSCHEMA HARNSTOFF-STICKSTOFF

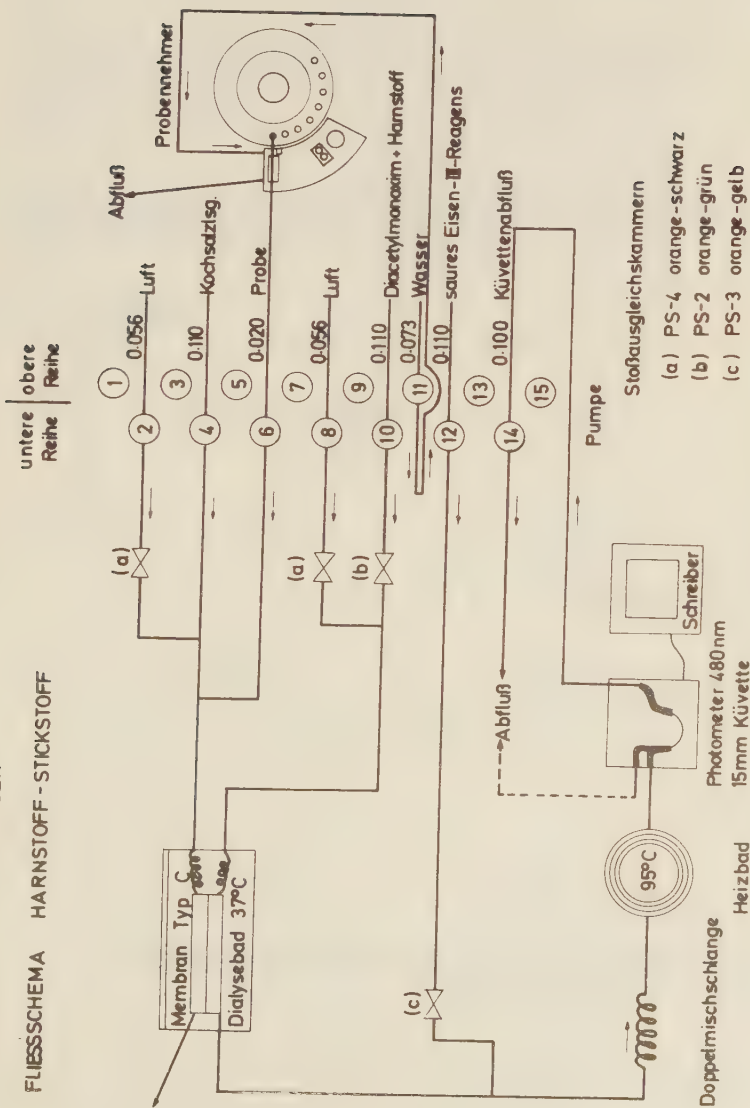


Abb. 16 : Autoanalyser-Fließschema zur Bestimmung der Harnstoff-Stickstoff-Konzentration im Serum (nach "Technicon Auto-Analyser methology").

und das Ganze auf dem Wasserbad bis zur völligen Lösung des PMA erhitzt. Nach dem Abkühlen wird quantitativ in einen 5-l-Meßkolben überführt. Nach Zugabe von 1,4 ml konz. Schwefelsäure wird mit dest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

2) Harnstoff-Stickstoff-Stammlösung: 21,433 g Harnstoff werden in einen 1-l-Meßkolben überführt. Nach Zugabe von ca. 500 ml Lösungsmittel wird bis zur völligen Lösung geschüttelt und schließlich bis zur Marke aufgefüllt.

3) Gebrauchsverdünnungen: Alle Verdünnungen werden mit dem oben angegebenen Verdünnungsmittel zubereitet.

ml Stammlösung	zu verd. auf	mg% Harnstoff-N
5,0		10
15,0		30
25,0	500 ml	50
35,0		70
50,0		100
75,0		150

Normalbereich: 12 - 23 μ g/100 ml Serum

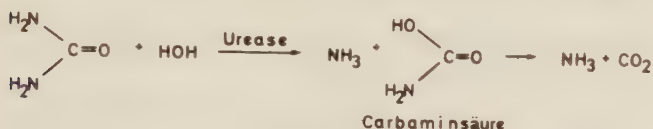
2.4.2.1.7 Literatur: 69, 159

2.4.2.2 Bestimmung von Harnstoff im Serum mit der BERTHELOT-Reaktion

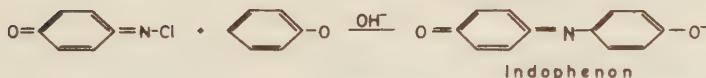
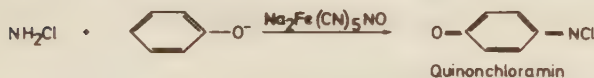
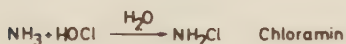
2.4.2.2.1 Prinzip:

Harnstoff wird in der durch Urease katalysierten Re-

aktion unter Bildung von Ammoniumcarbonat gespalten. Die hierbei entstehenden Ammoniumionen reagieren mit Phenol und Hypochlorit (BERTHELOT-Reaktion) unter Bildung eines blauen Farbstoffes, dessen Extinktion bei Hg 546 nm in 10-mm-Absaug-Mikroküvetten gemessen wird.



Das Reaktionsschema der BERTHELOT-Reaktion ist sehr schwer zu analysieren. Sie scheint jedoch folgendermaßen abzulaufen:



2.4.2.2.2 Reagenzien:

Testpackung "Harnstoff" der Firma Boehringer, Mannheim, TC-UR-I, Best. Nr. 15954 THAB.

Konzentrationen der Lösungen:

- 1) Ureasesuspension: 1 mg Urease/ml
- 2) Harnstoff-Standard: 0,03 mg Harnstoff/ml
- 3) Phenollösung: 0,106 M Phenol; $1,7 \cdot 10^{-4}$ M Nitroprussid-Natrium (= Natriumpentacyanonitrosylferrat III, $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 4) Hypochlorit-NaOH-Lösung: $1,1 \cdot 10^{-2}$ M Natriumhypochlorit; 0,125 M Natronlauge

2.4.2.2.3 Herstellung der Lösungen (Haltbarkeitsangaben der Firma):

- 1) Suspension in Flasche 1 unverdünnt verwenden. Vor Gebrauch schütteln. (Bei ca. 4° C ein Jahr haltbar.)
- 2) Lösung in Flasche 2 unverdünnt verwenden. (Bei ca. 4° C ein Jahr haltbar.)
- 3) Flasche 3, falls erforderlich, zur Verflüssigung des Phenols in warmes Wasser stellen. Inhalt der Flasche bei Packung TC-UR-I mit 500 ml bidest. Wasser vollkommen lösen. Flasche nachspülen! (In dunkler Flasche bei ca. 4° C vier Monate haltbar.)
- 4) Lösung in Flasche 4 bei Packung TC-UR-I auf 500 ml mit bidest. Wasser verdünnen. (In dunkler Flasche bei ca. 4° C vier Monate haltbar.)

2.4.2.2.4 Arbeitsweise:

In Reaktionsgefäße pipettieren:			
	Analyse	Standard	Leerwert
Serum	20/ul	--	--
physiolog. Kochsalzlösung	200/ul	--	--
Nach dem Verschließen der Gefäße mischt man 30 sec. Danach pipettiert man in neue Reaktionsgefäße:			
Ureasesuspension	20/ul	20/ul	20/ul
Serumverdünnung	20/ul	--	--
Standard	--	20/ul	--
zentrifugiert 5 - 10 sec nach Verschließen (Anmerkung 2) mischt 30 sec und temperiert 5 min bei 56° C im Thermostaten. Anschließend pipettiert man:			

	Analyse	Standard	Leerwert
Phenollösung	500/ul	500/ul	500/ul
Hypochloritlösung	500/ul	500/ul	500/ul

verschließt, mischt 30 sec und temperiert nochmals 10 min bei 56° C. Man stellt die Gefäße 10 min in den Kühltisch, mischt noch einmal kurz durch, zentrifugiert 15 sec und überführt je 300 ml in die 10-mm-Ab-saug-Mikroküvette und mißt die Extinktion der Serum-probe gegen die Blindprobe bei 546 nm. Zuvor wird die Extinktion der Blindprobe gegen dest. Wasser abgelesen, um einen Anhaltspunkt für die Verunreinigung des dest. Wassers mit Ammoniak zu bekommen.

2.4.2.2.5 Berechnung:

$$\frac{E_{\text{Analyse}}}{E_{\text{Standard}}} \cdot 15,4 = \text{mg Harnstoff-N/100 ml Serum.}$$

Normalbereich: 8 - 23 mg Harnstoff-N/100 ml Serum

2.4.2.2.6 Anmerkungen:

- 1) Zur Herstellung der Lösungen ist nur frisches, ammoniakfreies Wasser zu verwenden.
- 2) Nach dem Pipettieren von verdünntem Serum und Urease-Suspension wird kurz zentrifugiert, um die geringen Mengen sicher zu vermischen.

2.4.2.2.7 Literatur: 47, 69, 150, 159, 163, 164.

2.4.2.3 Harnstoff-Stickstoff-Bestimmung mit dem Urastrat-Stick

2.4.2.3.1 Prinzip: s. Abb. 17

2.4.2.3.2 Teststreifen:

Hersteller der Testpackung: Warner-Chilcott, Morris Plains, NJ.

Vertrieb: Gödecke u. Co., chem. Fabrik AG, Berlin

2.4.2.3.3. Arbeitsgang:

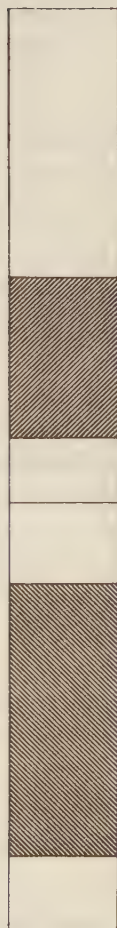
Die Methode eignet sich besonders zur orientierenden Bestimmung im Nacht- oder Sonntagsdienst.

In ein Urastrat-Teströhrchen werden mit einer ADH-Pipette 0,2 ml Serum eingebracht, ohne die Wandung zu benetzen. Der Teststreifen wird mit der kunststoffbedeckten Zone nach unten in das Röhrchen eingebracht, so daß er auf dessen Boden aufsteht, die Wandung jedoch nicht berührt, und in dieser Stellung mit einer Plastikbüroklammer fixiert. Man läßt 30 min bei Zimmertemperatur stehen, dann wird der Streifen entnommen und der untere Meniskus der verfärbten Testzone mit einem Bleistiftpunkt oder -strich markiert.

2.4.2.3.4 Auswertung:

Ausgewertet wird durch eine mitgelieferte Schablone, aus der man sowohl in mg Harnstoff/100 ml Serum als auch in mg Harnstoff-Stickstoff/100 ml Serum ablesen kann. Die Aufbewahrung der Streifen erfolgt im Kühlschrank bei ca. + 4° C.

Es wird stets ein Standardserum mit angesetzt, dessen Wert etwa bei 15 mg% Harnstoff-N liegt. Wird ein Testwert zu hoch, so daß er nicht mehr auf dem Streifen ablesbar ist, wird ein Testserum mit drei Teilen Standardserum



Wirkungsweise des Teststreifens

URASTRAT

papierchromatographische Harnstoff-Bestimmung
im Serum

Indikatorzone:

Das freie NH_3 reagiert mit weinsaurem Bromkresolgrün, zu dem eine starke Affinität besteht. Durch Bildung von Ammoniumtartrat wird der pH-Wert verschoben; auf der Indikatorzone entsteht ein Farbumschlag nach blau.

Die Höhe dieser Farbzone ist dem Gehalt des Serums an Harnstoff direkt proportional.

Krylonplastikschränke:

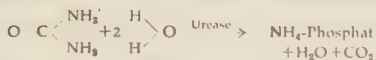
Sie blockiert das weitere Hinaufwandern des Serums.

Kaliumkarbonatzone:

Aus Ammoniumphosphat wird NH_3 gasförmig freigesetzt.

Lackschicht:

Unter der Lackschicht befindet sich phosphatgepufferte Urease, die den Harnstoff spaltet:



Dieses Ende des Streifens wird in Serum gestellt.

Abb. 17 (Aus BONITZ und FÜHR, 21).

gemischt und von dem Gemisch nochmals 0,2 ml in den Analysengang eingesetzt. Eine Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung führt wegen der Viskositätsveränderung und der damit verbundenen Veränderung der Steiggeschwindigkeit zu falschen Ergebnissen.

Die Berechnung erfolgt dann nach der einfachen Überlegung:

Abgelesener Wert x 4 minus bekannter Standardwert x 3
= Wert des Testserums.

Normalwerte: 10 - 23 mg/100 ml Serum

2.4.2.3.5 Literatur: 21, 71.

2.4.2.4 Ergebnisse der Qualitätskontrolle aus der Harnstoff-N-Bestimmung mit dem "Technicon"-Autoanalyser

2.4.2.4.1 Präzisionskontrolle

	$\bar{x}$	s	VK%
1. Ringversuch, T. T.,			
1. Ergebnis	13,36	0,58	4,3
2. Ergebnis	14,0	0,79	5,6
Schweineserum, T. T.	19,3	2,1	11
"pathologisches" Schweineserum, T. T.	80,1	3,5	4,3
2. Ringversuch, T. T.,			
1. Ergebnis	14,9	1,04	7,0
2. Ergebnis	14,7	1,0	6,8
Moni-Trol II X, T. T.	26,6	1,6	6,1

2.4.2.4.2 Richtigkeitskontrolle

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
1. Ringversuch, T. T.,				
1. Ergebnis	17,5	14,9	0,90	6,0
2. Ergebnis		14,7	0,96	6,5
Moni-Trol I	12,7	14,5	0,92	6,3

2.4.2.4.3 Bemerkungen:

Die Präzision dieser Harnstoffanalyse ist zwar nicht sehr befriedigend, für klinische Belange jedoch ausreichend. Die Ergebnisse der Richtigkeitskontrolle sind widersprüchlich: Gegenüber dem Sollwert von Moni-Trol I liegt unser Mittelwert 14 Prozent höher, wogegen wir bei dem 2. Ringversuch mit unseren Werten 15 Prozent zu niedrig liegen. Allerdings wurde letzterer Sollwert mit der BERTHELOT-Reaktion festgelegt. Der Mittelwert aller beteiligten Labors war 16,03 mg/100 ml. Zweifellos ist die Fehlerbreite in diesen niedrigen Konzentrationsbereichen schon durch die Ablesungenauigkeit der Schreiberkurve und die Schwankungen der Grundlinie relativ groß. Die Betrachtung von $\bar{N}$ im Zusammenhang mit den Kontrollergebnissen zeigt stellenweise eine deutliche Abhängigkeit. Zwangsläufig müssen sich Fehler der Eichtreppe oder Zeichnung der Eichkurve sowie Reagenzienveränderungen auf alle Werte auswirken. Die Eintragung von $\bar{N}$ und Kontrollwert in die gleichen graphischen Grenzen bringt dies deutlicher hervor als der Kontrollwert allein (s. Abb. 18).

Die beiden anderen Methoden zur Harnstoff-N-Analyse unterliegen keiner Qualitätskontrolle. Sie sind lediglich mit angeführt, weil sie im Not- und Nachtdienst verwendet werden. Obwohl dem Urastrat-Teststreifen von seiten vieler Ärzte mißtraut wird, fanden wir bei Doppelanalysen mit dem Autoanalyser stets gute Übereinstimmung. Dennoch wurde zusätzlich die BERTHELOT-Methode aufgebaut, da hiermit, etwa bei Ausfall des Autoanalysers, größere Mengen bewältigt werden können.

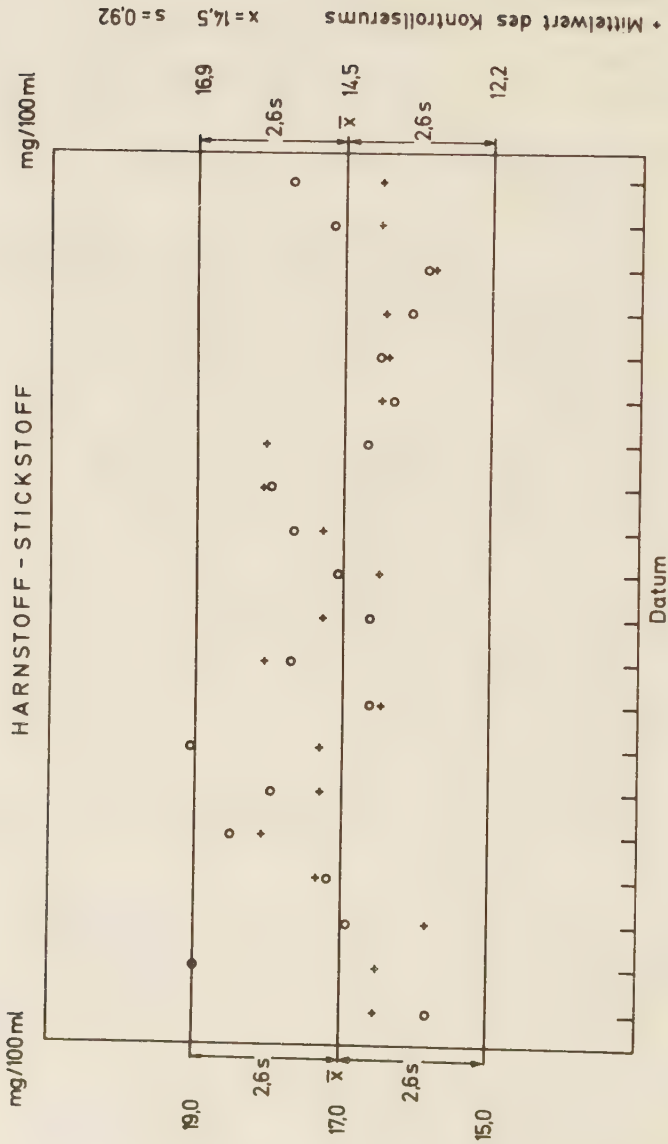


Abb. 18 : Qualitätskontrollkarte für Harnstoff-Stickstoff für die Kontrollperiode von 4. 5. bis 3. 6. 1970. Kontrollserum Moni-Trol I.

2.4.3.1 Mikroglucosebestimmung mit dem "Technicon"- Autoanalyser

2.4.3.1.1 Prinzip:

Die angewandte Methode zur Bestimmung von Glucose ist eine Abwandlung des von W.S. HOFFMANN (84) vorgeschlagenen Verfahrens. Dabei benützt man eine Kaliumferricyanid-Redox-Reaktion, in deren Verlauf die gelbe Kaliumferricyanidlösung unter Mitwirkung von Kaliumcyanid als Sensibilisator zur farblosen Kaliumferrocyanidlösung reduziert wird. Die Farbveränderung wird bei 420 nm in einer Zylinderküvette von 15 mm Schichtdicke gemessen.

Glucose kann aus Serum, Vollblut und Liquor bestimmt werden, und zwar aus Untersuchungsmengen bis hinab zu 0,1 bzw. 0,05 ml. Dabei ist eine Verdünnung der Proben erforderlich. Dazu wird das Untersuchungsgut auf 2,0 bzw. 1,0 ml verdünnt und daraus der Gehalt an Glucose bestimmt. Im übrigen ist die Methode der für Makroglucose ähnlich.

2.4.3.1.2 Reagenzien:

- 1) Kaliumcyanidlösung: In einen 1-l-Meßkolben, der etwa 500 ml dest. Wasser enthält, werden 18,0 g Natriumchlorid (Merck p.a. 6404) gegeben und bis zur Lösung geschüttelt. Dann werden 10 g KCN (Merck p.a. 4967) hinzugefügt, bis zur völligen Lösung gemischt und bis zur Marke aufgefüllt. Nach Filtration durch einen Faltenfilter wird die Lösung in eine braune Flasche abgefüllt und signiert. Man füge noch 0,5 ml Brij-35 hinzu und schüttele.
- 2) Alkalische Kaliumferricyanidlösung: In einen 1-l-Meßkolben, der etwa 500 ml dest. Wasser enthält, werden 18,0 g Natriumchlorid gegeben und bis zur Lösung geschüttelt. 0,5 g Kaliumferricyanid (Merck p.a. 4973) werden in einem Mörser zer-

kleinert und quantitativ mit dest. Wasser in den Meßkolben gespült. Dann wird bis zur völligen Lösung geschüttelt. 40,0 g Natriumcarbonat (Merck p.a. wasserfrei 6392) werden in kleinen Mengen dest. Wassers gelöst und quantitativ in den Kolben überführt. Nach vollständiger Lösung aller Substanzen wird bis zur Marke aufgefüllt und durch einen Faltenfilter in eine dunkle Flasche filtriert und signiert. Man füge noch 0,5 ml Brij-35 hinzu und schüttele.

- 3) Physiologische Kochsalzlösung mit 0,5 ml Brij-35 pro Liter.

2.4.3.1.3 Arbeitsweise: Fließschema siehe Abb. 19.

2.4.3.1.4 Hinweise:

- 1) Vorverdünnung des Untersuchungsgutes: 0,05 ml der Probe werden mit phys. Kochsalzlösung auf 1,0 ml verdünnt, was einem Verdünnungsfaktor von 1 : 20 entspricht. Aus diesen vorverdünnten Proben (vorzugsweise Blut, aber auch für Liquor wurde die Brauchbarkeit geprüft und bestätigt) wird dann die Glucosekonzentration bestimmt. Zur Gerinnungshemmung empfiehlt sich ein Zusatz von 0,03 % Oxalat und zur Hemmung glycolytischer Vorgänge ein Zusatz von 0,5 % Natriumfluorid.
- 2) Es können 60 Bestimmungen pro Stunde durchgeführt werden.
- 3) Zur Erreichung einer optimalen Luftblasenfolge und zur Herabsetzung der Schreiberunruhe sind je einem Liter der Kaliumcyanidlösung und der Ferricyanidlösung 0,5 ml Brij-35 zuzusetzen.
- 4) Bei diesem Verfahren wird die Farbabnahme einer Ferricyanidlösung gemessen, die durch eine Reagenziengrundlinie charakterisiert ist (inverse oder rückläufige kolorimetrische Technik). Um

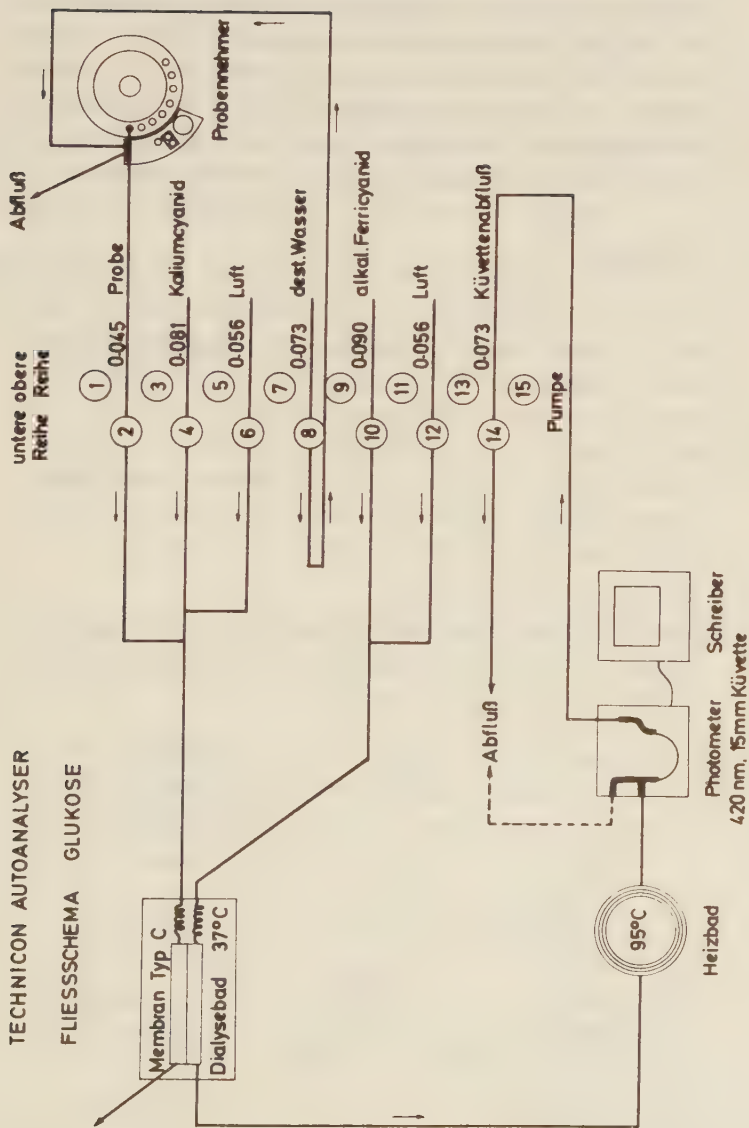


Abb. 19 : Fließschema zur Bestimmung der Blutzucker-Konzentration im Serum (nach "Technicon Auto-Analyser methology").

eine Bezugsgröße zu erhalten, pumpt man Wasser durch alle Leitungen und stellt den Schreiber auf 98 % Transmission ein. Dann werden die Leitungen in die zugehörigen Reagenzienflaschen gehängt und die Reagenziengrundlinie aufgezeichnet. Diese soll bei 13 ± 3 % liegen. Liegt sie höher als 16 % T, so kann das Ferricyanidreagens mit 5 % Kaliumferricyanid in 0,9 %iger Kochsalzlösung auf den oben vorgeschriebenen Wert eingestellt werden.

2.4.3.1.5 Eichung:

1) Glucose-Stammlösung: 1,0 g Dextrose wird auf der analytischen Waage abgewogen und in einen 1-l-Meßkolben überführt (Glucose: Fluka AG, A 4158). Dann wird etwas gesättigte Benzoesäurelösung (etwa 6 g auf 1 l dest. Wasser) zugegeben, bis zur Lösung geschüttelt und mit der Benzoesäurelösung bis zur Marke aufgefüllt. Es wird filtriert (Glucose-Stammlösung 100 mg/100 ml).

2) Gebrauchsverdünnungen:

Zur Verdünnung der Stammlösung wird gesättigte Benzoesäurelösung verwendet. Man pipettiert in je 500 ml Verdünnungslösung:

ml Stammlösung	Gehalt in mg% Glucose	entspricht Serumkonzentr. mg/100 ml
12,5	2,5	50
25,0	5,0	100
50,0	10,0	200
75,0	15,0	300
100,0	20,0	400
105,0	21,0	420

2.4.3.1.6 Auswertung:

Die Gipfelpunkte der einzelnen Peaks der Eichterpe

werden vom Schreiberpapier auf eine mitgelieferte durchsichtige Schablone als Ordinatenpunkte gegen die entsprechenden Konzentrationen als Abszisse durchgezeichnet. Da die Kurve nicht linear verläuft, werden die einzelnen Punkte mit einem Kurvenlineal in der üblichen Weise verbunden. Mit dieser durchsichtigen Schablone werden die einzelnen "peaks" der Patientenserum auf dem Schreiberpapier abgefahren. Die Konzentrationen lassen sich dann direkt (unter Berücksichtigung des Verdünnungsverhältnisses) in mg Glucose pro 100 ml Serum angeben.

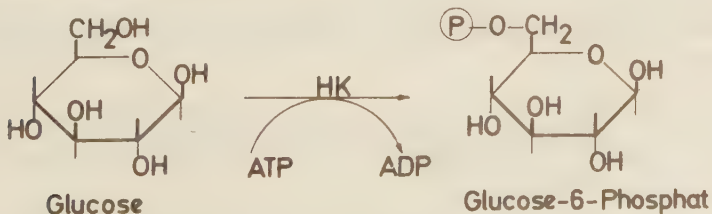
Normalbereich: 80 - 120 mg/100 ml Serum

2.4.3.1.7 Literatur: 84, 158, 165

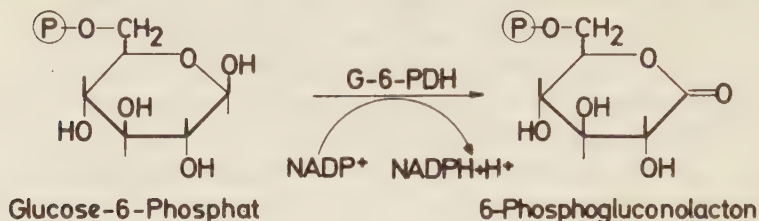
2.4.3.2 Glucose im Blut - UV-Test mit NADP (Mikrolitermethode)

2.4.3.2.1 Prinzip:

Glucose wird in der durch Hexokinase (HK) katalysierten enzymatischen Reaktion durch ATP zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert (90) :



Durch das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH) wird Glucose-6-Phosphat unter Mitwirkung von NADP in 6-Phosphogluconolacton überführt:



Die verbrauchte Menge NADP ist der umgesetzten Glucose-Menge äquivalent; die Extinktion des entstandenen NADPH wird bei 366 nm gemessen.

2.4.3.2.2 Reagenzien:

Biochemica Testcombination Boehringer: Glucose UV-Test mit NADP, TC-X-I Best. Nr. 15994 TGAA. Zusätzlich Perchlorsäure, ca. 0,33 M, Best. Nr. 15900 TYAE.

Konzentrationen der Lösungen:

- 1) 0,3 M Triäthanolaminpuffer, pH = 7,5;
 $4 \cdot 10^{-3} \text{ M MgSO}_4$
- 2) 0,012 M NADP;
- 3) 0,016 M ATP;
- 4) 1 mg Hexokinase/ml; 2 mg G-6-PDH/ml.

Herstellung der Lösungen (Haltbarkeit nach Angaben der Firma) :

- 1) Inhalt der Flasche 1 mit 80 ml bidest. Wasser lösen. (Bei Raumtemperatur ein Jahr haltbar.)
Datum!
- 2) Inhalt der Flasche 2 mit 2 ml bidest. Wasser lösen. (Bei ca. 4° C drei Wochen haltbar.) Datum!

- 3) Inhalt der Flasche 3 mit 2 ml bidest. Wasser lösen. (Bei ca. 4° C drei Wochen haltbar.). Datum!
- 4) Suspension in Flasche 4 unverdünnt verwenden. (Bei ca. 4° C ein Jahr haltbar.)

2.4.3.2.3 Arbeitsweise:*

2.4.3.2.3.1 Reaktionsgemisch

Jeweils vor Beginn der Bestimmung wird das für die vorliegende Anzahl der Bestimmungen benötigte Reaktionsgemisch hergestellt, um ein unnötig häufiges Pipettieren zu vermeiden:

Anzahl der Bestimmungen	Puffer	NADP	ATP	HK/G-6-PDH
1 - 2	1,0 ml	40/μl	40/μl	10/μl
3 - 5	2,5 ml	100/μl	100/μl	20/μl
6 - 10	5,0 ml	200/μl	200/μl	50/μl

2.4.3.2.3.2 Pipettierschema:

In Reaktionsgefäße pipettiert man:

	Analyse	Blindprobe
Perchlorsäurelösung	200/μl	200/μl
Blut (Anmerkung 1)	20/μl	--
bidest. Wasser	--	20/μl
Verschließen, 30 sec rütteln und dann 1 min zentrifugieren. Nun pipettiert man:		
Reaktionsgemisch	500/μl	500/μl
Überstand	50/μl	50/μl

*) Nach Eppendorf-Firmendruckschrift zum Mikrolitersystem.

verschließt, rüttelt 30 sec und mißt die Extinktion des Serumansatzes und der Blindprobe nach 10 - 15 min bei Hg 366 nm in der 10-mm-Absaugküvette gegen bidest. Wasser.

2.4.3.2.4 Berechnung:

$$(E_{\text{Serumansatz}} - E_{\text{Blindprobe}}) \cdot 650 = \text{mg Glucose/100 ml Blut}$$

(Anmerkung 2)

Normalwerte: 45 - 95 mg Glucose/100 ml Blut

2.4.3.2.5 Anmerkungen:

1. Die Blutpipette wird vorteilhaft einige Male mit der vorgelegten Enteiweißungslösung gespült.
2. Der empirisch ermittelte Faktor (Eichkurve) stimmt auf $\pm 1 \%$ mit dem berechneten Faktor von 650 überein.

2.4.3.2.6 Literatur: 46, 77, 137, 146, 157.

2.4.3.3 Qualitätskontrolle der Glucosebestimmung mit dem "Technicon"-Autoanalyser

2.4.3.3.1 Präzisionskontrolle

	$\bar{x}$	s	VK%
1. Ringversuch, T. T.,			
1. Ergebnis	90,8	5,94	6,5
2. Ergebnis	92,9	7,29	7,9
2. Ringversuch, T. T.,			
1. Ergebnis	126,5	9,02	7,3
2. Ergebnis	127,3	8,95	7,0

	$\bar{x}$	s	VK%
Moni-Trol II X, T. T.	212,0	7,61	3,6
Moni-Trol II X, T. T., P. korr.	214,4	16,5	7,7

2.4.3.3.2 Richtigkeitskontrolle

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.,				
1. Ergebnis	110,5	108,3	5,94	5,5
2. Ergebnis		108,0	6,89	6,4
Moni-Trol I, T. T.	84,0	84,0	7,89	9,4

2.4.3.3.3 Bemerkungen:

Die einfache Standardabweichung beträgt fast unabhängig von der Konzentration um 7 mg/100 ml Blut, was sich besonders bei niedrigen Werten als störend bemerkbar macht, obwohl die Richtigkeit der Methode zufriedenstellend ist. Daß weniger systematische als vielmehr zufällige Fehler die Ursache sind, zeigt die vergrößerte Streuung, bezieht man die Präzisionskontrolle auf die Richtigkeitskontrolle. Deshalb entschloß man sich inzwischen zu einer Umstellung der Glucosebestimmung auf die Hexokinase-methode, die halbautomatisch mit dem digitalen Meßplatz der Firma Eppendorf unter Zuhilfenahme eines Probe-Reagens-Dosierers ausgeführt wird. Mit dieser Bestimmung, die im Routine-Labor von Hand bisher nur im Not- und Nachtdienst ausgeführt wurde (sich im Insulin-Labor der Klinik jedoch bewährt hat), lagen bei Beendigung des experimentellen Teiles dieser Arbeit noch keine Qualitätskontroll-Ergebnisse vor.

2.4.4 Serum- und Liquor-Elektrophorese auf Zelluloseacetatfolien

2.4.4.1 Methodik

2.4.4.1.1 Zubehör (wenn nicht anders angegeben, von der Firma Bender und Hobein, München, bezogen) :

- 1) Elphor-Anschlußgerät für 200 V Gleichstrom (vom Techniker der Klinik, Herrn J. HENNER, gebaut).
- 2) Elphor-Mikrokammer mit Folienbrücke für 18 Streifen
- 3) Glaskapillare zum Auftragen des Serums
- 4) Zelluloseacetatfolien 20 x 160 mm
- 5) Objektträger zum Aufziehen der Acetatstreifen
- 6) Zeiss-Elektrophorese-Auswertgerät mit Extinktions- und Integrationsschreiber und entsprechenden Linealen zum Auswerten
- 7) Heißlufttrockenschrank mit 105° C
- 8) Lösungen: Pufferlösung pH = 8,6 . Die gelieferten Puffer (Bender und Hobein) 1 : 2 mit dest. Wasser verdünnen.

Entfärbelösung (1 Teil Eisessig + 9 Teile Methanol)

Transparenzbad (Eisessig)

Amidoschwarzlösung zum Anfärben der Eiweißfraktionen

2.4.4.1.2 Arbeitsgang

2.4.4.1.2.1 Serum-Elektrophorese:

Die der Packung entnommenen Zelluloseacetatfolien läßt man flach in die Schale fallen, die den Puffer enthält. Erst wenn die Streifen sich voll Flüssigkeit geso-

gen haben und untergegangen sind (sonst Luftblaseneinschlüsse) werden sie mit einer Pinzette herausgenommen und zwischen Filterpapier von überflüssiger Feuchtigkeit befreit. Die Streifen werden luftblasenfrei auf die Foliensbrücke, die vorher mit glattem, puffergetränktem Filterpapier belegt wurde, aufgezogen, so daß ein guter elektrischer Kontakt zwischen dem Puffer und dem Streifen besteht. Die Streifen dürfen einander nicht berühren, sollen aber wegen optimaler Ausnützung der Kammer nicht weiter als 1 mm voneinander entfernt liegen. Zum Auftragen des Serums legt man ein Lineal parallel zur Innenkante der Trennbrücke und trägt das Serum etwa 1 cm entfernt von dieser Kante im frei durchhängenden Teil des Streifens mit einer Glaskapillare auf. Es werden etwa 0,001 ml Serum benötigt. Die Auftragstelle soll geradlinig, dünn und gleichmäßig sein, rechtwinklig zur Längsseite des Streifens, und dieser nicht näher als 3 mm kommen. Die Auftragkapillare wird durch Eintauchen gefüllt und durch Ausschleudern entleert. Auf diese Weise wird sie auch zwischen den einzelnen Seren dreimal mit dest. Wasser gespült. Die Laufrichtung der Fraktionen ist von der Kathode zur Anode. Die Polanschlüsse der Kammer werden jedesmal vertauscht, damit eine Polarisierung vermieden wird. Die Trennzeit beträgt 45 min bei 200 V, was eine Trennstrecke von ca. 5 cm ergibt. Die Spannung wird von Hand eingestellt und beim Anstecken einer zweiten Kammer nachkorrigiert. Der Widerstand und damit die Stromstärke, die das Netzgerät anzeigt, hängt von der Zahl der Streifen pro Kammer ab. Nach dem Trennen werden die Streifen in einer gesättigten Amidoschwarzlösung etwa 5 min hin- und herbewegt. Ohne Zwischentrocknung werden sie nacheinander in 4 Entfärbebädern jeweils etwa 3 min vom überflüssigen Farbstoff befreit, bis die Eiweißfraktionen deutlich sichtbar und die Zwischenräume rein weiß sind. Man trägt die Streifen luftblasenfrei, jedoch ohne sie zu dehnen, mit einer Gummirolle auf einen Glasobjektträger auf und schneidet sie auf die richtige Länge zu. Dabei werden sie neu beschriftet (Faber DIN 033/064 blau oder Pelikan 517 DIN 16554 blau). Man bringt die Streifen 3 min unter dem

Abzug in ein Transparenzbad, das aus reinem Eisessig besteht. Dadurch wird die Zelluloseacetatfolie glasklar und die einzelnen Eiweißfraktionen erscheinen als klare blaue Streifen verschiedener Breite und Farbdichte. Der Objektträger wird noch 5 min in einen Trockenschrank mit 105°C eingebracht. Bei dieser Temperatur zieht die Folie fest auf das Glas auf.

2.4.4.1.2.2 Liquor-Elektrophorese:

Normaler Liquor enthält nur etwa 0,5 % der Eiweißkonzentration des Serums und muß daher vor der Elektrophorese eingeeengt werden. Dazu werden 2 bis 3 ml Liquor in eine Kollodiumhülse (Sartorius-Membranfilter) gebracht, die so in einem evakuierbaren Glasgefäß steckt, daß der Liquor und die Innenseite der Kollodiumhülse unter atmosphärischem Luftdruck steht, die Außenseite etwa bis zur halben Höhe mit Wasser umgeben ist. Mit Hilfe einer Vakuumpumpe wird nun auf die Wasseroberfläche ein bis zwei Stunden ein Unterdruck ausgeübt, wodurch die Liquorflüssigkeit und in ihr gelöste niedermolekulare Substanzen langsam durch die Filterhülse gepreßt werden. Das führt zu einer Konzentrationserhöhung des Eiweißes im noch zurückgebliebenen Liquor. Der Grad der notwendigen Einengung hängt von der Eiweißausgangskonzentration des Liquors ab (100, 113).

2.4.4.1.3 Auswertung:

Die photometrische Auswertung geschieht mit einem Zeiss-Extinktions- und Integralschreiber, der die Extinktionskurven der Eiweißfraktionen und deren Integral auf zwei verschiedenen DIN-A5-Papierblättern mit gleicher Geschwindigkeit (4,2 cm/min) schreibt. An der Integralkurve läßt sich die Größe der einzelnen Fraktionen mit dem Lineal ablesen. (Die einzelnen Schritte der Auswertung sind der Bedienungsanleitung des Gerätes zu entnehmen.)

2.4.4.1.4 Normalbereiche

2.4.4.1.4.1 Serum:

Die angegebenen Normalbereiche wurden durch Untersuchung von rund 50 gesunden "Normalpersonen" an der Klinik mit der beschriebenen Methode ermittelt:

Fraktion	$\bar{x}$	s	Normalbereich ($\bar{x} \pm 2s$)
Albumin	65,8	4,9	56,1 - 75,5
Globuline: Alpha 1	2,7	0,7	1,3 - 4,0
Alpha 2	6,6	0,4	5,8 - 7,5
Beta	10,5	1,9	6,1 - 14,4
Gamma	14,3	2,9	8,5 - 20,1

2.4.4.1.4.2 Liquor:

Die folgenden Normalbereiche wurden durch Untersuchung des Liquors von einhundert gesunden Personen im Jahre 1966 von Herrn M.KRÄTZSCHMAR und Frau JAEGY (100) mit der damals durchgeführten Papier-Elektrophorese ermittelt. Für die Zelluloseacetat-Auftrennung wurden bisher keine neuen Werte aufgestellt.

Angegeben sind der Mittelwert und die doppelte Standardabweichung:

Vorfraktion	$4,5 \pm 3,1$
Albumine	$56,1 \pm 8,7$
Globuline: Alpha 1	$7,1 \pm 2,6$
Alpha 2	$18,0 \pm 2,6$
Beta	$18,1 \pm 5,1$
Gamma	$9,2 \pm 2,7$

2.4.4.1.5 Literatur: 32, 72, 96, 100, 113, 119, 120.

2.4.4.2 Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Serum-Elektrophorese

	Alb.	α_1	α_2	β	γ
<u>Präzisionskontrolle,</u>					
Moni-Trol II X, T.T., $\bar{x}$	55,2	3,7	6,92	12,25	21,6
s	3,1	0,83	1,31	1,65	1,9
VK%	5,6	22	19	13	9
<u>Richtigkeitskontrolle:</u>					
Sollwert	59,5	4,5	9,0	10,5	16,5
Moni-Trol I, T.T., $\bar{x}$	59,0	4,02	8,6	13,98	15,78
s	2,93	0,84	1,32	1,67	2,15
VK%	5,0	21	15	12	13

Bemerkungen:

Die beschriebene Methode enthält eine große Zahl von störanfälligen Einzelschritten, die alle von Hand ausgeführt werden müssen und daher auch großen individuellen Schwankungen unterworfen sind (z.B. Auftragechnik, aufgetragene Serum-Menge). Nicht umsonst bestehen starke Bestrebungen, das Verfahren so weit wie möglich zu automatisieren. Leider ist das der Industrie bisher nur auf Teilgebieten gelungen.

Es ist geplant, die tägliche Berechnung von $\bar{N}$ auch auf die einzelnen Fraktionen der Serum-Elektrophorese auszudehnen, damit systematische Fehler (etwa verbrauchte Puffer oder Entfärbeküden, falsche Spannung) entdeckt werden können, denn bei der relativ geringen Präzision in der Elektrophorese der Kontrollseren (ausgenommen Albumin), sind diese Fehler unter Umständen durch alleinige chemische Qualitätskontrolle schwer aufzudecken.

2,5 Methoden, bei denen nur die neuen Mikroliterverfahren
kontrolliert wurden

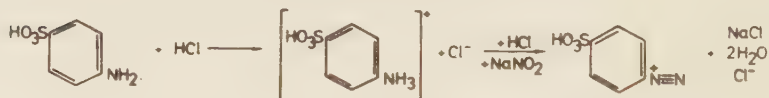
2.5.1 Konjugiertes und gesamtes Bilirubin im Serum - Mikrolitermethode

2.5.1.1 Methodik

2.5.1.1.1 Prinzip und Reaktionsschema:*

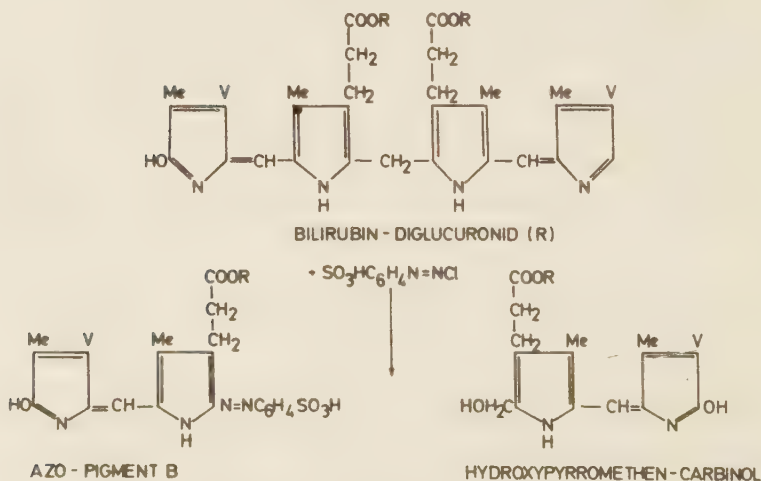
Bilirubin bildet mit diazotierter Sulfanilsäure einen wasserlöslichen Azo-Farbstoff. Der Reaktionsmechanismus dieser Vorgänge ist heute weitgehend geklärt und soll schematisch wiedergegeben werden:

1) Bildung von Diazoniumchlorid:



2) Bildung der Azo-Farbstoffe (Kupplung)

a) Bilirubin-Diglucuronid (Pigment II, direktes oder konjugiertes Bilirubin): Nach Aufbrechen der Methinbrücke reagiert das eine Dipyrrol



*) Nach RICHTERICH, 126

direkt mit Diazoniumchlorid und bildet ein Molekül Pigment B. Das zweite isomere Dipyrrol wandelt sich dabei in Hydroxypyrrromethen-Carbinol um. In einem zweiten Schritt reagiert auch dieses Molekül mit einem weiteren Molekül Diazoniumchlorid zu einem isomeren Pigment B.

- b) Freies Bilirubin (auch indirektes oder unkongugiertes Bilirubin) : Dieses wasserunlösliche, nicht an Glucuronsäure gekoppelte Pigment wird zuerst durch Zusatz von Akzeleratoren (Coffein) von der Eiweißbindung freigesetzt. Auch hierbei entstehen in zwei Stufen zwei isomere Azo-Farbstoffe, die als Pigment A bezeichnet werden. Bei der Kupplung von Diazoniumchlorid und Bilirubin entsteht der typische rote Azo-Farbstoff. Beim Zusatz von Tartrat-NaOH wird die Farbentwicklung gestoppt und der rote Azo-Farbstoff blau. Nebenprodukte aus dem Diazoreagens und Serumbestandteilen bleiben gelb. Vor dem Auge entsteht eine Mischfarbe: grün. Die Spektren zeigen jedoch, daß das gelbe Pigment bei den Meßwellenlängen 578 bzw. 546 nm keine Extinktion mehr zeigt, somit nicht stört.

2.5.1.1.2 Reagenzien:

Testpackung "Bilirubin" der Fa. Boehringer, Mannheim (TC-BI, Best. N 15944 I BAA).

Konzentrationen:

- 1) 0,029 M Sulfanilsäure, 0,17 N HCl (Diazo I)
- 2) 0,025 M Na NO₂ (Diazo II)
- 3) 0,077 M Coffein-Natriumbenzoat
- 4) 0,93 M Tartrat 1,9 N Na OH
- 5) Physiolog. Kochsalzlösung p.a. (0,9 %ig)

Die Lösungen werden bereits gebrauchsfertig geliefert.

Man halte sie gut verschlossen, um eine Konzentrierung durch Wasserverdunstung zu vermeiden.

2.5.1.1.3 Arbeitsweise:*

2.5.1.1.3.1 Pipettierschema Gesamt-Bilirubin

In Reaktionsgefäße pipettieren	Leerwert	Analyse
Sulfanilsäure	50 μ l	50 μ l
Nitrit	--	10 μ l
Coffein-Na-benzoat	200 μ l	200 μ l
Serum	50 μ l	50 μ l
Gefäße verschließen, 30 sec mischen und 10 min bei Raumtemperatur stehenlassen.		
Tartrat - NaOH	200 μ l	200 μ l
Gefäße verschließen, 30 sec mischen und 5 min bei Raumtemperatur (20 - 25° C) stehenlassen. Je 300 μ l der Ansätze in 10-mm-Absaugküvetten überführen, Leerwert bei 578 nm auf E = 0 kompensieren und zugehörige Analyse dagegen ablesen (E _{GB}).		

2.5.1.1.3.2 Pipettierschema konjugiertes Bilirubin

In Reaktionsgefäße pipettieren	Leerwert	Analyse
Sulfanilsäure	50 μ l	50 μ l
Nitrit	--	10 μ l
physiol. Kochsalzlösung	500 μ l	500 μ l
Serum	50 μ l	50 μ l

*) Nach Boehringer-Firmendruckschrift zum Mikroliter-system.

Gefäße verschließen und 30 sec rütteln. Nach genau 5 min (Stoppuhr) pipettiert man je 300 μ l der Ansätze in 10-mm-Absaugküvetten und mißt die Extinktion der Probe bei 546 nm gegen den Leerwert, den man vorher auf $E = 0$ kompensiert hat (E_{DB}).

Bei hohen Extinktionen, die nicht mehr genügend genau abzulesen sind, sind entsprechende Vorverdünnungen des Serums mit physiologischer Kochsalzlösung vorzunehmen. Die Ergebnisse sind danach zu korrigieren.

2.5.1.1.4 Berechnung:

$E_{GB} \times 9,0 = \text{mg Gesamt-Bilirubin/100 ml Serum}$

$E_{DB} \times 14,4 = \text{mg konjugiertes Bilirubin/100 ml Serum}$

Normalbereich:

Gesamt-Bilirubin bis 1,2 mg/100 ml;

konjugiertes Bilirubin: bis 0,25 mg/100 ml

2.5.1.1.5 Eichung: siehe Eppendorf-Firmendruckschrift zum Mikrolitersystem. Der Berechnungsfaktor wurde von uns nur durch Richtigkeitsseren überprüft.

2.5.1.1.6 Literatur: 4, 13, 34, 43, 87, 88, 111, 126, 129, 130, 143.

2.5.1.2 Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Bilirubin-Analyse

2.5.1.2.1 Präzisionskontrolle

	$\bar{x}$	s	VK%
Moni-Trol II X, T. T.	2,29	0,18	7,9

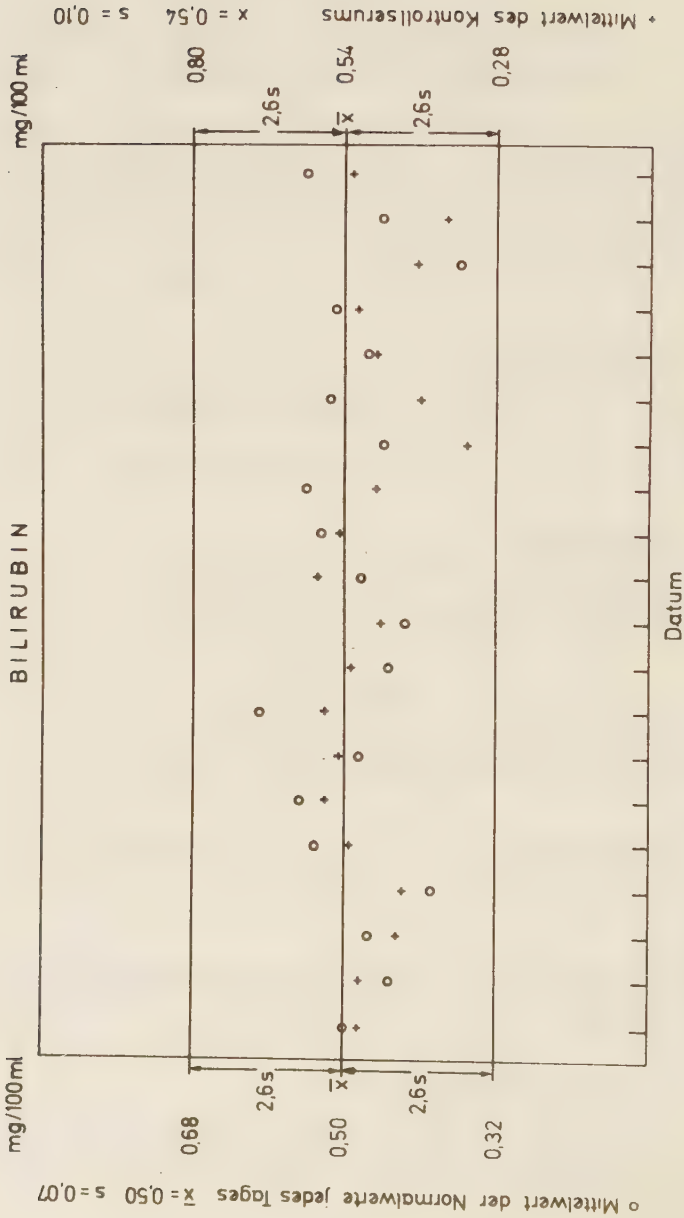


Abb. 20 : Qualitätskontrollkarte für Bilirubin im Serum für die Kontrollperiode von 4. 5. bis 3. 6. 1970. Kontrollserum Moni-Trol I.

2.5.1.2.2 Richtigkeitskontrolle

	Sollwert $\bar{x}$		s	VK%
Moni-Trol I, T. T.	0,55	0,54	0,10	18

2.5.1.2.3 Bemerkungen

Der Qualitätskontrolle dieser Methode sind wegen der schlechten Haltbarkeit des Bilirubins grundsätzlich Schranken auferlegt. Es eignen sich nur lyophilisierte Kontrollseren, die nach der Rekonstitutionierung rasch dem Analysengang zugeführt werden müssen. Deshalb fehlte die Bilirubinbestimmung auch im Programm der beiden Ringversuche. Auch hier bedeutet die tägliche Berechnung von $\bar{N}$ eine echte Bereicherung der Kontrollmöglichkeiten. Wie aus der abgebildeten Kontrollkarte deutlich zu ersehen ist, folgt $\bar{N}$ dem Kontrollwert. Eine Ursache systematischer Fehler ist vor allem die tägliche Zubereitung des Diazo-Gemisches (I + II), das in seiner Zusammensetzung zufälligen Fehlern unterworfen ist (Pipettenfehler, Reagenzienzustand, Durchmischung etc.). Die Zusammensetzung beeinflusst aber die ganzen Werte eines Tages. Die Streuung der Kontrollwerte ist auffallend groß. Ein Teil der Abweichung dürfte auf Kosten der ungleichen Einflüsse gehen, dem die Kontrollseren bis zur Verarbeitung ausgesetzt sind (unterschiedliche Lichteinstrahlung, Temperatur, Zeit).

2.5.2 Die Bestimmung der Transaminasen G O T und G P T

2.5.2.1 Methodik

2.5.2.1.1 Prinzip:

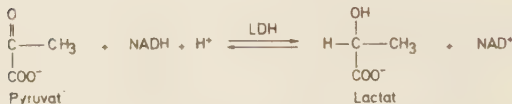
Das Meßprinzip für die Aktivitätsbestimmung dieser beiden Enzyme ist identisch: Man bietet den Transaminasen die beiden Substrate an und läßt ein Reaktionsprodukt unter NADH-Verbrauch und durch Katalyse eines Hilfsenzym weiterreagieren (Indikatorreaktion). Die Geschwindigkeit des NADH-Verbrauches ist die Meßgröße der Aktivitätsbestimmung. Sie wird im UV-Test bei 366 nm kinetisch (Kompensationsschreiber) gemessen. Die Arbeitsweise für beide Nachweisverfahren ist völlig gleich.

Reaktionsschemata:

Glutamat-Oxalacetat-Transaminase



Glutamat-Pyruvat-Transaminase



2.5.2.1.2 Reagenzien:

Biochemica-Testcombination, Boehringer, Mannheim.

2.5.2.1.2.1 "GOT - Test" (Kennwort TC-A-II, Nr. 15955 TGAF)

1. Phosphat/Asparaginat (Ph/Asparag)

0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 0,04 M L-Asparat.

Die in Fläschchen 1 der Testkombination befindliche Substanz wird mit bidest. Wasser im Fläschchen vollständig gelöst und auf 300 ml verdünnt.

2. Red. Diphosphopyridinnucleotid (NADH) 0,012 M

Die in Fläschchen 2 befindliche Substanz wird mit 5,0 ml bidest. Wasser vollständig gelöst.

3. Malatdehydrogenase (MDH) 0,25 mg MDH/ml + 0,25 mg LDH/ml

Die in Fläschchen 3 befindliche Substanz wird unverdünnt verwendet.

4. α - Ketoglutarat (KG) 0,25 M Lösung des Natriumsalzes

Die in Fläschchen 4 der Testkombination befindliche Substanz wird mit 10 ml bidest. Wasser im Fläschchen gelöst.

2.5.2.1.2.2 "GPT - Test" (Kennwort TC-H-II, Nr. 15956 TGAK)

1. Phosphat/Alanin (Ph/Alanin)

0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 0,08 M DL-Alanin

Die in Fläschchen 1 der Testkombination enthaltene Substanz wird mit bidest. Wasser im Fläschchen vollständig gelöst und auf 300 ml verdünnt.

2. Reduz. Diphosphopyridinnucleotid (DPNH) 0,012 M

Die in Fläschchen 2 befindliche Substanz wird mit 5,0 ml bidest. Wasser vollständig gelöst.

3. Lactatdehydrogenase (LDH) 0,25 mg Enzymprotein/ml

Die in Fläschchen 3 befindliche Lösung wird unverdünnt verwendet.

4. α - Ketoglutarat (KG) 0,25 M Lösung des Natriumsalzes

Die in Fläschchen 4 befindliche Substanz wird mit 10 ml bidest. Wasser gelöst.

2.5.2.1.3 Arbeitsweise:*

2.5.2.1.3.1 Reaktionsgemisch:

Jeweils unmittelbar vor dem Ansatz werden die Lösungen 1, 2 und 3 in Mengen, die sich nach der Anzahl der durchzuführenden Bestimmungen richten, vermischt:

Anzahl der Bestimmungen:	Lsg. 1 ml	Lsg. 2 /ul	Lsg. 3 /ul
2 - 4	1	20	20
5 - 10	2,5	50	50
11 - 14	3,5	70	70
15 - 20	5,0	100	100
21 - 40	10,0	200	200

Die Gefäße, die die Reaktionsgemische enthalten, sind deutlich zu beschriften (GOT bzw. GPT), damit Verwechslungen vermieden werden.

2.5.2.1.3.2 Pipettierschema:

Die Aktivitätsbestimmung wird mit Hilfe eines Küvettenwechselautomaten durchgeführt, zu dem zwei auswechselbare Küvettenhalter mit je sechs 10 mm-Mikroküvetten (200/ul Füllvolumen) gehören. Die Impulse zum Weitertransport der Küvetten werden alle 30 sec vom Kompensationsschreiber gegeben. Jeder Küvetteninhalt wird dreimal

*) Nach Eppendorf-Firmendruckschrift zum Mikrolitersystem

30 sec lang gemessen.

Man pipettiert in 6 Reaktionsgefäße je

50 μ l Serum

200 μ l Reaktionsgemisch (frisch angesetzt, ca. 25° C)

verschließt, rüttelt 30 sec und temperiert 5 - 15 min bei 25° C.

Dann pipettiert man in die Reaktionsgefäße je

10 μ l Ketoglutarat

rüttelt 10 sec und überführt jeweils 200 μ l dieser Mischungen in sechs 10-mm-Mikroküvetten, die sich im Küvettenhalter des Küvettenwechselautomaten befinden.

Die Verstärkung am Photometer wird so gewählt, daß bei Hg 366 nm oder Hg 334 nm und Extinktionsspreizung 0 - 1 an der Transformationsstufe normal gefärbtes Serum (nicht ikterisch oder lipämisch) etwa Extinktion 0,5 zeigt.

Der Papiervorschub beträgt 1 cm/min, die Wechselfrequenz 30 sec, der Bereich E = 0 - 1 .

Durch Handauslösung wird zunächst Küvette Nr. 1 in den Strahlengang gebracht und der Meßvorgang durch Einschalten des Papiervorschubes bzw. durch Einschalten des Zählwerkes in Gang gesetzt. Die Aufzeichnung von Küvette Nr. 1 wird jeweils auf dem Registrierpapier mit einem Punkt markiert.

Es ist darauf zu achten, daß auch die automatische Meßbereichserweiterung und der Impulsgeber am Schreiber eingeschaltet sind.

Nach 3 Durchgängen wird der Meßvorgang automatisch abgebrochen und der Inhalt der Küvetten mit einer Wasserstrahlpumpe über einen 2 mm-Polyäthylenschlauch abgesaugt. Der Küvettenhalter wird abgenommen und ein zweiter mit gestarteten Testansätzen auf den Küvettenwechselautomaten gesetzt und der Meßvorgang wiederholt.

Die Meßzeit benutzt man jeweils zum Pipettieren der nächsten Testansätze, welche nach Vorinkubation etwa 1 - 2 Minuten, bevor die im Wechselautomaten befindlichen Proben zu Ende gemessen sind, durch Zugabe von 10 μ l Ketoglutar-säure gestartet werden. Man füllt wieder je 200 μ l Ge-misch in die sechs Küvetten und tauscht den Halter gegen einen bereits durchgemessenen aus.

Durch diese Arbeitsweise gelangt man zu einer guten Ausnutzung des Küvettenwechselautomaten.

2.5.2.1.4 Berechnung

2.5.2.1.4.1 Grundsätzliches zur Berechnung der Enzym-aktivitäten:*

Die Grundlage aller photometrischen Messungen in der Klinischen Chemie stellt das Gesetz von LAMBERT-BEER dar:

$$I \quad E = \xi \cdot c \cdot d$$

Dabei bedeutet E die Extinktion, c die Konzentration der zu messenden Substanz, d die Schichtdicke und ξ den mola-ren Extinktionskoeffizienten, eine für jeden Stoff bei gegebener Wellenlänge charakteristische Konstante. Durch Auflösung nach c erhält man:

$$II \quad c = \frac{E}{\xi \cdot d}$$

Wir verwenden für alle Aktivitätsbestimmungen stets die Internationale Einheit (U). Sie ist als die Enzymmenge definiert, die bei 25° C 1 μ Mol Substrat pro Minute um-setzt:

$$III \quad \text{Aktivität: } 1 \text{ U} = \frac{1 \mu\text{Mol Substrat-Umsatz}}{\text{min}} = \frac{\Delta c}{\text{min}}$$

*) Nach einer Boehringer-Firmendruckschrift (10).

Durch Kombination mit II erhält man für die Aktivität:

$$\text{IV} \quad A = \frac{E}{\text{min} \cdot \xi \cdot d} \left[\frac{\frac{\mu\text{Mol}}{\text{min} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{cm}}}{\text{min} \cdot \text{ml}} = \frac{\frac{\mu\text{Mol}}{\text{min} \cdot \text{ml}}}{\text{min} \cdot \text{ml}} \right]$$

Da definitionsgemäß der Substratansatz eines μMol pro Minute einer Internationalen Einheit U entspricht, ergibt sich als Dimension für die Aktivität A :

$$\left[\frac{U}{\text{ml}} \right]$$

U ist jedoch eine sehr große Einheit, und man rechnet daher mit dem tausendsten Teil : 1 U = 1000 mU. Unter Berücksichtigung des Gesamt- (V) und Probevolumens (v) kommt man zu folgender Gleichung für die Berechnung der Enzymaktivitäten:

$$\text{V} \quad \frac{\text{mU}}{\text{ml}} = \frac{A \cdot E \cdot 1000 \cdot V}{\text{min} \cdot \xi \cdot d \cdot v}$$

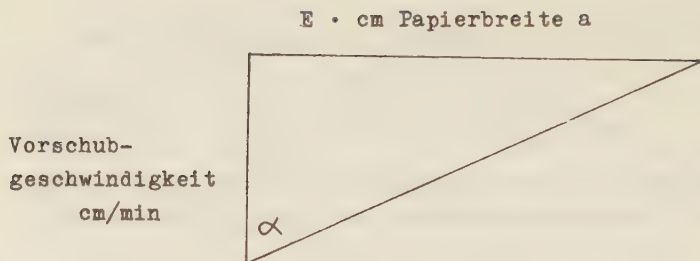
Da für eine Methode Gesamtvolumen, Probevolumen, Schichtdicke und molarer Extinktionskoeffizient immer konstant bleiben, kann man sie zu einem Faktor zusammenfassen und erhält

$$\text{VI} \quad f = \frac{10^3 \cdot V}{\xi \cdot d \cdot v}$$

und

$$\text{VII} \quad \frac{\text{mU}}{\text{ml}} = f \cdot \frac{A \cdot E}{\text{min}}$$

womit sich die Enzymaktivität leicht berechnen läßt. Bedient man sich der kinetischen Messung mit Hilfe eines Schreibers, so ist es einfacher, die Enzymaktivität direkt aus dem geschriebenen Winkel zur Null-Linie zu berechnen, wozu es einer Umformung bedarf:



Günstigerweise rechnet man mit dem Tangens (Gegenkathe-
te : Ankathete) des Winkels:

$$\text{VIII} \quad \text{tg } \alpha = \frac{\text{E} \cdot \text{a} \text{ cm} \cdot \text{min}}{\text{cm}}$$

Durch Einsetzen von VII :

$$\text{IX} \quad \frac{\text{mU} \cdot \text{min}}{\text{ml} \cdot \text{f}} = \frac{\text{tg } \alpha}{\text{a} \cdot \text{min}} \quad \text{oder} \quad \frac{\text{mU}}{\text{ml}} = \frac{\text{f} \cdot \text{tg } \alpha}{\text{a}}$$

2.5.2.1.4.2 Für die Bestimmung der Transaminasen-Aktivität
nach obiger Arbeitsvorschrift gelten folgende
Zahlen:

$$\epsilon_{\text{NADH}} \text{ bei } 366 \text{ nm} = 3,3 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$$

$$\text{Gesamtvolumen } V = 0,260 \text{ ml}$$

$$\text{Probevolumen } v = 0,050 \text{ ml}$$

$$\text{Schichtdicke } d = 1,0 \text{ cm}$$

$$\text{Papiervorschub} = 1 \text{ cm/min}$$

$$\text{Registrierpapierbreite } a = 20 \text{ cm}$$

Demnach lautet der Faktor f :

$$f = \frac{10^3 \cdot 0,260}{3,3 \cdot 5 \cdot 10^{-2}} = 1575$$

Die Aktivität berechnet sich nach der Gleichung:

$$\frac{\text{mU}}{\text{ml}} = \frac{\text{tg } \alpha \cdot 1575}{20} = 79 \cdot \text{tg } \alpha$$

Der molare Extinktionskoeffizient von NADH beträgt bei 334 nm 5,9 cm²/μMol. Die Berechnungsformel der Aktivitäten lautet dann : mU/ml = 44 · tg .

Normalbereich: 0 bis 15 mU/ml für beide Transaminasen.

2.5.2.1.5 Anmerkungen:

1. Sind die gemessenen Extinktionsdifferenzen pro Minute bei 366 nm größer als 0,05, bei 334 nm größer als 0,09, entsprechend 80 mE/ml, wird der Ansatz mit einer im Verhältnis 1 : 5 oder 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Serumprobe wiederholt.
2. Zeigt ein Serum überhaupt keine Aktivität, so ist zu vermuten, daß vor Beginn der Messung alles DPNH verbraucht wurde (zu hohe Aktivität). In diesem Falle wird wie unter Anmerkung 1 verfahren.

2.5.2.1.6 Literatur: 1, 3, 10, 14, 15, 27, 48, 49, 85, 91, 92, 101, 138, 162, 168.

2.5.2.2 Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Transaminasen-Aktivitäts-Bestimmung

2.5.2.2.1 G O T

2.5.2.2.1.1 Präzisionskontrolle

	$\bar{x}$	s	VK%
Patholog. Patientenserum, Serie (n = 24)	52,9	1,19	2,3

	$\bar{x}$	s	VK%
Normalserum, Serie (n = 24)	11,05	0,54	4,9
2. Ringversuch, T. T.	31,8	3,31	10,4

2.5.2.2.1.2 Richtigkeitskontrolle

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.	52,3	47,6	3,11	6,5
Moni-Trol I, T. T.	12,0	10,9	1,15	10,0
Prezinorm E, T. T.	42,1	36,9	1,56	4,2

2.5.2.2.2 G P T

2.5.2.2.2.1 Präzisionskontrolle

	$\bar{x}$	s	VK%
Normalserum, Serie (n = 24)	6,99	0,17	2,5
2. Ringversuch, T. T.	30,07	1,6	4,3

2.5.2.2.2.2 Richtigkeitskontrolle

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.	53,7	52,8	2,4	4,5
Moni-Trol I, T. T.	8,0	7,6	1,3	17,0
Prezinorm E, T. T.	33,3	33,5	2,14	6,4

2.5.2.2.3 Bemerkungen

Leider ist es uns durch die Inkonstanz unseres Stromnetzes bisher nicht möglich, bei 334 nm zu messen. Die dabei auftretende Schreiberunruhe verhindert eine vernünftige Auswertung. Der bei 366 nm etwa um die Hälfte kleinere Extinktionskoeffizient des NADH vergrößert die Streuung der Ergebnisse, vor allem im unteren Bereich, beträchtlich. Deshalb kamen wir auch von einer Kontrolle der Richtigkeit mit Moni-Trol I ab (bei Moni-Trol II X beträgt die Aktivität beider Transaminasen nur 2 - 3 mU/ml) und gingen auf Prezinorm E (Kontroll-Nr. 901 A, B, C) über



Abb. 21 : Qualitätskontrollkarte der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase für die Kontrollperiode von 25. 6. bis 29. 7. 1970. Kontrollserum Prezinorm E

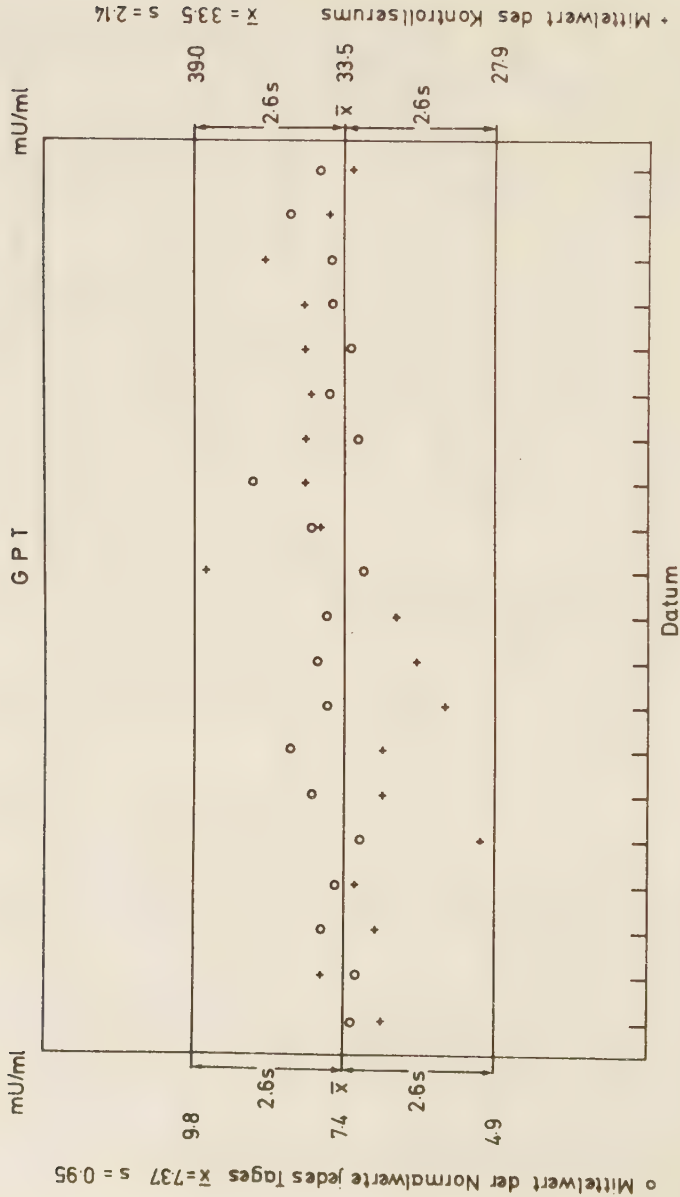


Abb. 22 : Qualitätskontrollkarte der Glutamat-Pyruvat-Transaminase für die Kontrollperiode von 25. 6. bis 29. 7. 1970. Kontrollserum Prezinorm E

(Fa. C.F. Boehringer u. Soehne, Mannheim, GmbH, Biochem. Abteilung). Weiterhin sollte angesichts der zu niedrigen Ergebnisse bei der GOT-Richtigkeitskontrolle die Frage der Einführung eines substratoptimierten Tests diskutiert werden (102). Auch hier hat sich die tägliche Errechnung von $\bar{N}$ bewährt: Betrachtet man die abgebildete Kontrollkarte der GPT, so sieht man am 5. und 11. Tag die Kontrollwerte nahe der Alarm-Grenze, während $\bar{N}$ beide Male an der Zentrallinie liegt. Hier handelte es sich eindeutig um zufällige Fehler bei der Bestimmung der Kontrollserum-Aktivität (und damit Fehler I. Art), die ohne Berechnung von $\bar{N}$ sicher viel Arbeit und Unkosten verursacht hätten.

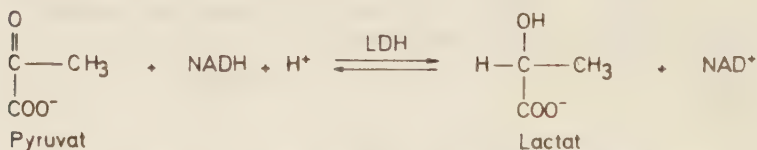
Aus straßenbaulichen Gründen verlegte die Stadt München unglücklicherweise ausgerechnet während der Zeitdauer dieser Arbeit Straßenbahngleise unmittelbar an die Hauswand der Klinik. Dadurch war der Enzymmeßplatz nicht mehr als 4 m von der Oberleitung entfernt. Die Feldstörungen durch die Straßenbahn machten ein Arbeiten bei höherer Verstärkung (334 nm, Photomultiplier) vollkommen unmöglich.

2.5.3 Die Bestimmung der Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) im Serum

2.5.3.1 Methodik *

2.5.3.1.1 Prinzip:

Das Enzym LDH katalysiert die wasserstoffübertragende Reaktion



deren Gleichgewicht weit auf der Seite von Lactat und NAD^+ liegt. Zur Messung der Aktivität der LDH im Serum verfolgt man den zeitlichen Umsatz von Pyruvat und NADH durch Messung der mit Extinktionsabnahme verbundenen Umwandlung von NADH in NAD pro Zeit bei 366 nm.

2.5.3.1.2 Reagenzien:

Biochemica-Testcombination Boehringer "LDH"
Kennwort TC-G, Best. Nr. 15977.

2.5.3.1.3 Herstellung der Lösungen (Haltbarkeitsangaben der Firma) :

1. Phosphat/Pyruvat-Lösung (enthält einen 0,05-Molaren Phosphat-Puffer für pH = 7,5 und eine Pyruvatkonzentration von $3,1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)

Die in Fläschchen 1 der Testkombination enthaltene Substanz wird in dest. Wasser gelöst und auf 80 ml verdünnt. Die Lösung ist im Kühlschrank einige Wochen haltbar.

*) Nach Eppendorf-Firmendruckschrift zum Mikrolitersystem.

2. NADH-Lösung, $8 \cdot 10^{-3}$ M

Die in Fläschchen 2 der Testkombination befindliche Substanz wird in 1,5 ml dest. Wasser gelöst und im Fläschchen im Kühlschrank aufbewahrt. Die Lösung ist maximal 4 Wochen haltbar.

2.5.3.1.4 Arbeitsweise:

Die Phosphat/Pyruvat-Lösung und die Serumprobe werden 10 Minuten auf 25° C temperiert.

Die Mikroabsaugküvette wird mit dest. Wasser gefüllt und die Empfindlichkeit des Photometers bei 366 nm auf $E = 0$ eingestellt.

Nun pipettiert man in ein Reaktionsgefäß

200/ul Phosphat/Pyruvat-Lösung

5/ul DPNH-Lösung

10/ul Serum

rüttelt ca. 10 sec, überführt 200/ul der Mischung in die 10-mm-Mikroküvette (der Küvettenhalter ist auf 25° C temperiert) und kompensiert auf eine Ausgangsextinktion von etwa 0,5. Gleichzeitig startet man den Schreiber. Die Papiergeschwindigkeit beträgt 1 cm/min, der Meßbereich $E = 0$ bis 1.

2.5.3.1.5 Berechnung: (Prinzip siehe bei Transaminasen)

$$\text{mU/ml} = 326 \cdot \text{tg} \alpha$$

Normalbereich: 95 - 240 mU/ml

2.5.3.1.6 Anmerkung:

Läuft die Reaktion mit gekrümmter Umsatzkurve ab, so ist das Serum 1 + 4 mit physiolog. Kochsalzlösung zu verdünnen. Das Ergebnis muß mit 5 multipliziert werden.

2.5.3.1.7 Literatur: 3, 16, 38, 39, 50, 135, 136,
138, 162.

2.5.3.2 Ergebnisse der Qualitätskontrolle der LDH-
Aktivitäts-Bestimmung

2.5.3.2.1 Präzisionskontrolle

	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.	140,7	13,8	9,5
Moni-Trol II X, T. T.	93,2	13,9	15,0

2.5.3.2.2 Richtigkeitskontrolle

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
2. Ringversuch, T. T.	207,8	209,6	16,5	8,0
Moni-Trol I, T. T.	136,0	136,3	17,0	12,5
Prezinorm E, T. T.	187,0	169,7	18,7	11,0

2.5.3.2.3 Bemerkungen:

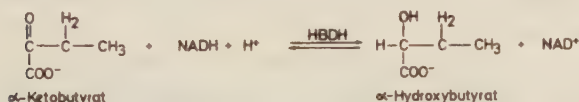
Bei der beschriebenen Arbeitsweise ist eine Verbesserung der Präzision nur durch Messung bei 334 nm möglich. An der oberen Grenze des Normalbereiches, da, wo das diagnostische Interesse beginnt, kann Präzision und Richtigkeit als zufriedenstellend bezeichnet werden (vergleiche 2. Ringversuch).

2.5.4 Die Bestimmung der α -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase im Serum

2.5.4.1 Methodik

2.5.4.1.1 Prinzip:

Die α -HBDH katalysiert die Reduktion von α -Ketobuttersäure mit $\text{NADH} + \text{H}^+$ nach der Gleichung:



Die Bestimmung ist zusammen mit einer LDH-Bestimmung besonders wertvoll, da der Vergleich der beiden Tests eine Unterscheidung von Herz- und Leberschäden ermöglicht.

2.5.4.1.2 Reagenzien:

Boehringer Testcombination LDH-1-Isoenzym TC-HD
Best. Nr. 15953 THAD.

1. 0,05 M Phosphatpuffer, pH = 7,4. Inhalt der Flasche 1 im 200-ml-Meßkölbchen mit dest. Wasser lösen und bis zur Marke auffüllen. Die Lösung schüttern und in eine Reagensentnahmeflasche einfüllen.
2. 0,004 M NADH. Inhalt einer Flasche 2 bei Bedarf mit 2,5 ml dest. Wasser lösen. Bei 4° C etwa 3 Wochen haltbar (Angabe der Firma).
3. 0,10 M α -Ketobutyrat. Inhalt der Flasche 3 mit 6,5 ml dest. Wasser lösen. Bei 4° C ca. 3 Monate haltbar (Angabe der Firma).

2.5.4.1.3 Arbeitsweise:

Den aus dem Kühlhaus kommenden Puffer 1/2 h im Warmen stehenlassen und auf etwa 25° C vortemperieren. Dann in

Reaktionsgefäße pipettieren:

1 Puffer	300 μ l
2 NADH-Lösung	10 μ l
Serum	10 μ l
30 sec rütteln und 5 min bei 25° C temperieren	
3 α -Ketobutyratlösung	10 μ l

10 sec rütteln und 200 μ l des Ansatzes in eine 10-mm-Mikroküvette überführen, bei 366 nm auf eine Ausgangsextinktion von etwa 0,5 kompensieren und Schreiber starten (Papiervorschub 1 cm/min, Skalenspreizung E = 0 - 1).

Nach ca. 3 min Schreiber stoppen, die erhaltene Gerade mit Bleistift und Lineal verlängern und den Winkel zur Senkrechten ablesen.

Arbeiten mit Wechselautomat:

Man startet 6 Ansätze gleichzeitig mit α -Ketobutyrat, rüttelt und überführt je 200 μ l in die 6 Küvetten des Wechselaufsatzes. Ausgangsextinktion auf etwa 0,5, Papiervorschub 1 cm/min.

Auswertung mit Enzymtestauswerter "Eppendorf" und Tabelle.

2.5.4.1.4 Berechnung:

$$\text{tg } \alpha \times 500 = \text{mU } \alpha\text{-HBDH pro ml Serum.}$$

(Theorie der Faktorenberechnung siehe bei Transaminasen.)

Normalwerte: 60 - 135 mU/ml

$$\text{Quotient LDH}/\alpha\text{-HBDH} \quad 1,38 \quad - \quad 1,62$$

Pathologische Werte:

LDH/ α -HBDH über 1,62 spricht für Leberschaden

LDH/ α -HBDH unter 1,38 spricht für Herzmuskelschaden

2.5.4.1.5 Anmerkung:

Ergibt die Auswertung der Schreiberkurve keine Gerade oder ist der gemessene Winkel auffallend klein bzw. gleich Null, so sind 20 μ l Serum mit 100 μ l physiolog. Kochsalzlösung zu verdünnen und der Ansatz mit 10 μ l dieser (gut gemischten Verdünnung) zu wiederholen (Ergebnis mal sechs).

2.5.4.1.6 Literatur: 3, 17, 134, 135, 138, 162.

2.5.4.2 Ergebnisse der Qualitätskontrolle der α -HBDH-Aktivitäts-Bestimmung

2.5.4.2.1 Präzisionskontrolle

	$\bar{x}$	s	VK%
Moni-Trol II X, T. T.	70,2	7,6	10,8

2.5.4.2.2 Richtigkeitskontrolle

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
Moni-Trol I, T. T.	115,0	112,3	12,1	10,8
Prezinorm E, T. T.	142,0	123,1	12,5	10,0

2.5.4.2.3 Bemerkungen:

Auch hier ließe sich eine weitgehende Verbesserung der Präzision nur durch Messung bei 334 nm erreichen. Während die Richtigkeitskontrolle mit Moni-Trol I zufriedenstellend ausfiel, lagen unsere Ergebnisse bei Prezinorm E im Mittel um 13 % zu niedrig - der Grund konnte bisher nicht ausgemacht werden.

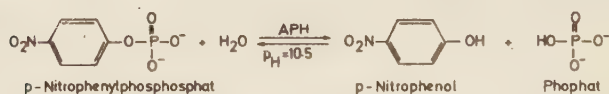
2.5.5 Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase (APH) im kinetischen Test

2.5.5.1 Methodik*

2.5.5.1.1 Prinzip:

Phosphatasen katalysieren die Hydrolyse von Phosphorsäureestern. Entsprechend den pH-Bereichen ihrer Wirkungsoptima werden alkalische und saure Phosphatasen unterschieden.

Das als Substrat dienende p-Nitrophenylphosphat wird durch Enzymwirkung in p-Nitrophenol und Phosphat gespalten:



Das zu untersuchende Serum läßt man auf das Substrat einwirken und mißt die Extinktionsänderung pro Zeit. Meßgröße ist das gelb gefärbte p-Nitrophenol.

2.5.5.1.2 Reagenzien:

Biochemica-Testcombination "Alkalische Phosphatase" der Firma Boehringer, Mannheim (Best.-Nr. 15987 TAAF).

1. 0,05 M Glycinpuffer, pH = 10,5; $5 \cdot 10^{-4}$ M MgCl_2 .
Lösung in Flasche 1 mit 200 ml bidest. Wasser verdünnen. Flasche stets verschlossen halten. Bei $+ 4^\circ \text{C}$ ein Jahr haltbar (nach Angabe der Firma).
2. Für je 10 Bestimmungen eine Tablette aus Flasche 2 entnehmen und mittels Magnetrührer in 10 ml Puffer lösen. Ein Erwärmen über 25°C muß dabei

*) Nach Eppendorf-Firmendruckschrift zum Mikrolitersystem.

streng vermieden werden. Die Lösung sollte nach unseren Erfahrungen täglich frisch bereitet werden.

Endkonzentrationen der Puffersubstratlösung:

$5 \cdot 10^{-2}$ M Glycin-Puffer, pH = 10,5;

$5 \cdot 10^{-4}$ M MgCl_2 ;

$5,5 \cdot 10^{-3}$ M Natrium-p-Nitrophenylphosphat.

2.5.5.1.3 Arbeitsweise (mit Küvettenwechselautomat):

Man pipettiert in 6 Reaktionsgefäße je

1000 μl Puffer-Substrat (25°C)

10 μl Serum

verschließt, rüttelt 30 sec und überführt je 200 μl dieser Mischung in die sechs 10-mm-Mikroküvetten 4020, die sich in dem auf 25°C temperierten Küvettenhalter 2720 des Küvettenwechselautomaten befinden.

Die Verstärkung am Photometer wird so gewählt, daß bei Hg 405 nm und Meßbereich $E = 0 - 1$ an der Transformationsstufe etwa $E = 0,1$ angezeigt wird.

Bei Geräten mit automatischer Meßbereichsumschaltung ist darauf zu achten, daß die Bereichsanzeige im Bereich $E = 0 - 1$ steht. Der Papiervorschub beträgt 1 cm/min, die Wechselfrequenz 30 sec. Durch Handauslösung wird zunächst Küvette Nr. 1 in den Strahlengang gebracht und der Meßvorgang durch Einschalten des Papiervorschubes bzw. des Zählwerkes in Gang gesetzt. Die Küvette Nr. 1 wird jeweils auf dem Registrierpapier mit Namen oder Kennziffer markiert. Es ist darauf zu achten, daß auch die automatische Meßbereichsumschaltung und der Wechselautomat am Schreiber eingeschaltet sind.

Nach 3 Durchgängen des Küvettenhalters wird der Meßvorgang abgebrochen und der Inhalt der Küvetten mit einer Wasserstrahlpumpe über einen 2-mm-Polyäthylenschlauch abgesaugt. Der Küvettenhalter wird abgenommen und ein zwei-

ter mit fertigen Testansätzen auf den Küvettenwechselauf-
tomaten gesetzt und der Meßvorgang wiederholt.

3 - 4 Minuten, bevor die Meßzeit beendet ist, pipet-
tiert man die nächsten 6 Testansätze.

2.5.5.1.4 Auswertung:

$$\text{mU/ml} = \text{tg}\alpha \cdot 273.$$

(Über die theoretischen Grundlagen siehe Transami-
nasen-Bestimmung.)

Normalbereich: bis 35 mU/ml.

2.5.5.1.5 Anmerkung:

Sind die Extinktionsdifferenzen $\Delta E/\text{min}$ zu Beginn
der Messung größer als 0,2, so wird die Bestimmung mit
dem 1 : 5 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten
Serum wiederholt und das Ergebnis mit 5 multipliziert.

2.5.5.1.6 Literatur: 3, 5, 18, 25, 51, 57, 78,
98, 138, 154, 162.

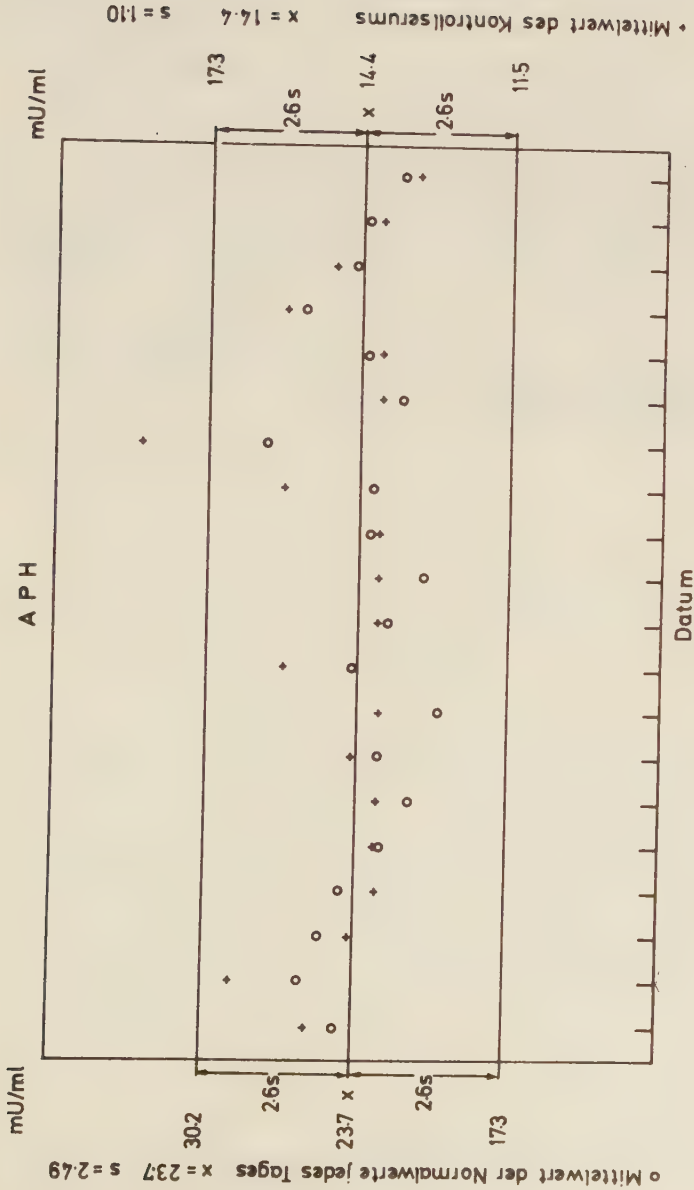
2.5.5.2 Ergebnisse der Qualitätskontrolle der APH- Aktivitäts-Bestimmung

2.5.5.2.1 Präzisionskontrolle

	$\bar{x}$	s	VK%
Moni-Trol II X, T. T.	12,3	1,65	13,5

2.5.5.2.2 Richtigkeitskontrolle

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
Moni-Trol I	12,0	14,4	1,1	7,6



2.5.5.2.3 Bemerkungen

Die beschriebene Methode der APH-Aktivitäts-Bestimmung ist kein echter kinetischer Test, er wurde lediglich an ein kinetisches Verfahren adaptiert. Die geschriebenen Winkel sind im Normalbereich sehr klein, die Fehlerbreite deshalb hier besonders groß. Hier kann durch Einführung des kinetischen Tests mit Diäthanolamin-HCl-Puffer (der nicht wie der Glycinpuffer die Phosphatase-Aktivität hemmt), eine weitgehende Verbesserung der Präzision erzielt werden. Die übliche Eintragung von $\bar{N}$ in die Kontrollkarten zeigt wieder einen deutlichen Bezug der beiden Kontrollgrößen zueinander. Hier liegt ein täglich wechselnder systematischer Fehler in Form der Zusammensetzung der Puffersubstratlösung (pH-Wert, Pipettierfehler beim Ansetzen der Puffersubstratlösung etc.) vor.

2.5.6 Die Bestimmung der sauren Phosphatasen im Serum

2.5.6.1 Methodik*

2.5.6.1.1 Prinzip:

Die im sauren Medium wirksamen Phosphatasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von p-Nitrophenylphosphat. Das freigesetzte p-Nitrophenol ergibt mit Natronlauge eine Gelbfärbung, deren Extinktion bei 405 nm gemessen wird. (Formelschema siehe alkalische Phosphatase.)

2.5.6.1.2 Reagenzien:

Biochemica-Testcombination "Saure Phosphatase"
der Firma Boehringer, Mannheim (Kennwort: TC-Q
Best.-Nr. 15988).
(Haltbarkeitsangaben der Firma):

1. 0,05 M Citrat-Puffer (pH = 4,8): Die in Fläschchen 1 der Testkombination enthaltene konzentrierte Puffer-Lösung wird mit 100 ml bidest. Wasser verdünnt. Die Lösung wird fest verschlossen bei 4⁰ C im Kühlschrank aufbewahrt.
2. Puffer-Substrat-Gemisch (0,05 M Citratpuffer, pH = 4,8; 0,0055 M Natrium-p-Nitrophenylphosphat): Eine Substrat-Tablette aus Fläschchen 2 der Testkombination wird in 10 ml Pufferlösung gelöst. Die Lösung wird wegen der schlechten Haltbarkeit des Gemisches (Ausflocken des Substrates) täglich frisch bereitet (Anmerkung 1).
3. Natronlauge 0,02 M, Boehringer-Zusatzreagens, Best. Nr. 15903 TYAB.

*) Nach Eppendorf-Firmendruckschrift zum Mikrolitersystem.

2.5.6.1.3 Arbeitsweise:

In zwei Reaktionsgefäße pipettiert man:

	Analyse	Blindprobe
Serum	20 μ l	--
Puffer-Substrat	100 μ l	100 μ l
verschließt, rüttelt 30 sec und stellt die Gefäße bei 37° C in den Thermostaten. Nach genau 30 min pipettiert man		
Natronlauge	1000 μ l	1000 μ l
Serum	--	20 μ l
hinzu, verschließt, rüttelt 30 sec und mißt die Extinktion der Serumprobe und der Blindprobe bei Filter Hg 405 nm (Anmerkung 2) in 10-mm-Absaugküvetten gegen dest. Wasser.		

2.5.6.1.4 Berechnung:

$$E_{\text{Serumansatz}} - E_{\text{Blindprobe}} \cdot 101 = \text{mU/ml}$$

Normalbereich: 4 bis 11 mU/ml;

Kinder bis zum 15. Lebensjahr 11 - 17,5 mU/ml.

Bei Frauen liegt der obere Grenzwert um etwa 2 mU/ml niedriger als bei Männern (115).

2.5.6.1.5 Anmerkungen:

1. Verwendeten wir mehrere Tage hintereinander das gleiche Puffer-Substrat-Gemisch, so lag - trotz Aufbewahrung bei + 4° C - die SPH-Aktivität von Moni-Trol (täglich frisch geöffnete Flasche) bis zu 30 % höher als die am Vortag gemessene.
2. Bei Extinktionen über 0,5 verdünnt man das Serum 1 + 10 mit physiolog. Kochsalzlösung und setzt von dieser Verdünnung 20 μ l ein. Das Ergebnis ist mit 11 zu multiplizieren.
3. Bei leicht hämolytischen Seren soll man zur Aus-

schaltung der Erythrozyten-Phosphatase Probe und Blindprobe mit je 5 μ l 10 %iger, mit Natronlauge frisch neutralisierter Formaldehydlösung versetzen. Eigene Erfahrungen mit dieser Methode bestehen nicht.

2.5.6.1.6 Literatur: 3, 19, 52, 54, 114, 138, 154, 162.

2.5.6.2 Ergebnisse der Qualitätskontrolle der SPH-Aktivitäts-Bestimmung

2.5.6.2.1 Präzisionskontrolle

	$\bar{x}$	s	VK%
Moni-Trol II X, T. T.	1,18	0,24	20,0

2.5.6.2.2 Richtigkeitskontrolle

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
Moni-Trol I, T. T.	1,5	1,00	0,16	16,0

2.5.6.2.3 Bemerkungen

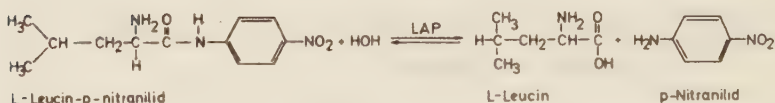
Eine Qualitätskontrolle an der unteren Nachweisgrenze hat wenig Sinn und wird auch nie eine befriedigende Präzision bringen. Hier muß zu einem Kontrollserum übergegangen werden, dessen SPH-Aktivität im leicht erhöhten Bereich liegt.

2.5.7 Die Bestimmung der Leucin-Amino-Peptidase-Aktivität im Serum

2.5.7.1 Methodik*

2.5.7.1.1 Prinzip:

Die LAP katalysiert in vitro die Reaktion:



Man inkubiert Serum mit Puffersubstrat bei 25° C und mißt kinetisch bei 405 nm die Entstehung von Nitranilid anhand der Extinktionsänderung pro Zeit als Ausdruck der LAP-Aktivität.

2.5.7.1.2 Reagenzien:

Testpackung der Fa. Boehringer, Mannheim
TC - LAP (Best. Nr. 15952 TLAF).

1. 0,05 M Phosphatpuffer pH = 7,2
2. 0,025 M Leucin-p-nitranilid
3. Methanol p.a.

2.5.7.1.3 Herstellung der Lösungen (Haltbarkeitsangaben der Firma) :

1. Inhalt der Flasche 1 mit 100 ml bidest. Wasser lösen. (Bei ca. + 4° C ein Jahr haltbar.)
2. Inhalt der Flasche 2 mit 3 ml Methanol lösen. (Bei ca. + 4° C sechs Monate haltbar.)

*) Nach Boehringer Firmendruckschrift "Mikrolitermethoden".

2.5.7.1.4 Arbeitsweise

2.5.7.1.4.1 Ansetzen eines Reaktionsgemisches (man pipettiert mit ADH-Stabpipette bzw. Mikroliterpipette) :

Zahl der Best.	Lösung 1	Lösung 2
2	1,5	0,05
5	3,0	0,10
10	6,0	0,20
15	9,0	0,30
20	12,0	0,40

Das Gemisch ist ca. 12 h haltbar. Es ist vor Gebrauch in einem Reaktionsgefäß 5 min auf 25° C zu temperieren.

2.5.7.1.4.2 Pipettierschema:

In ein Reaktionsgefäß pipettieren:	Analyse
Reaktionsgemisch	500/ul
Serum	50/ul
Man mischt und überführt 200/ul des Ansatzes mit der Pipette in eine 10-mm-Mikroküvette. Der Küvettenhalter ist auf 25° C temperiert. Man kompensiert bei Filter Hg 405 nm auf eine Extinktion um 0,5 und startet den Kompensationsschreiber mit einem Papiervorschub von 1 cm/min (Registrierbereich E = 0 - 1). Man zeichnet etwa 3 min die Extinktionszunahme pro Zeit auf.	

2.5.7.1.5 Berechnung: $\Delta E/\text{min} \cdot 1111 = \text{mU}/\text{ml}$.

Durch Umformung mit der Tangensfunktion erhält man für 1 cm /min Papiervorschub:

$$\text{mU}/\text{ml} = \text{tg} \alpha \cdot 55,55 .$$

Daraus läßt sich eine Tabelle errechnen, anhand der man aus dem Winkel direkt die LAP-Aktivität ablesen kann.

Normalbereich: 8 - 22 mU/ml Serum (25° C)

NB: Bei Aktivitäten über 300 mU/ml Serum ist ein gründliches Zwischenspülen der Küvette mit dest. Wasser unbedingt erforderlich.

2.5.7.1.6 Literatur: 3, 20, 26, 86, 89, 107, 117, 138, 167, 187.

2.5.7.2 Ergebnisse der Qualitätskontrolle der LAP-Aktivitäts-Bestimmung

2.5.7.2.1 Präzisionskontrolle

	$\bar{x}$	s	VK%
Moni-Trol II X	10,1	2,0	20,0

2.5.7.2.2 Richtigkeitskontrolle

	Sollwert	$\bar{x}$	s	VK%
Moni-Trol I	11,0	11,7	1,1	9,5

2.5.7.2.3 Bemerkung:

Auch hier wäre eine Kontrolle im leicht erhöhten Bereich wünschenswert. Dennoch sind Richtigkeit und Präzision des Verfahrens befriedigend.

- 2,6 Abhängigkeit der Prothrombinzeit von der Calcium- und H^+ - Ionenkonzentration und Beschreibung eines neuen photoelektrischen Verfahrens zur Bestimmung des Quickwertes.*

*) Auszugsweise in Zschr. Klin. Chem. Klin.Biochem.
9, 33 (1971)

Die Bestimmung des Quickwertes ist heute zu einer der Routinemethoden im klinisch-chemischen Laboratorium geworden (108, 109, 123). Abgesehen von der Überwachung der Wirkung von Cumarinderivaten (68), hat die Methode längst ihren festen Platz im diagnostischen Screening-Programm. Die mit der wachsenden Anzahl der durchzuführenden Untersuchungen einhergehende Belastung des Labors erfordert rationellere und zuverlässigere Meßverfahren.

2.6.1 METHODIK

2.6.1.1 Visuelle Handmethode:

Da im Zentrallabor zur Vereinfachung für die Stationen aus demselben Citratblut Blutsenkung nach WESTERGREN und Quickwert ermittelt werden, ist für die Klinik die Citratblutgewinnung einheitlich auf 1 ml 0,1 molarer Natriumcitratlösung plus 4 ml Venenblut in einer 5-ml-Einmalspritze festgelegt. Ein Teil des gut durchgemischten Spritzeninhalts wird zur Plasmagewinnung im Labor in Mikrolitergefäßen bei 12000 x g eine Minute zentrifugiert. 100 Mikroliter des Überstandes werden mit einer Marburgpipette in ein schmales Glasröhrchen ($d = 10$ mm, $h = 100$ mm) eingefüllt und darin im Wasserbad auf 37° C gebracht. Das Wasserbad liegt in Augenhöhe, die Glaswände bestehen aus planen Scheiben, die Reagenzröhrchen hängen nahe der Vorderwand und sind von unten beleuchtet. Eine starke Lupe erleichtert die Beobachtung. Aus einer Tuberkulinspritze werden mit Auslösen einer Stoppuhr 200 Mikroliter eines Gemisches von einem Teil Thrombokinaselösung (2) (Thromboplastin^R, Hoffmann-La Roche) und einem Teil einer 0,025 M Calciumchloridlösung hinzugefügt. Man mißt die Zeit bis zum Auftreten des ersten Fibrinfadens am Glashäkchen, das man durch das Gemisch zieht.

Geeicht wird die Methode mit Verdünnungsreihen (100, 90, 80, 70 bis 10 Prozent Citratplasma in physiologischer Kochsalzlösung) aus zwei bis drei Plasmen von männlichen Gesunden, deren Prothrombinzeit zwischen 11 und 12 Sekunden liegt, was bei dieser Arbeitsweise dem Bereich

der einfachen Standardabweichung der Prothrombinzeiten eines Normalkollektivs entspricht. Für jede neue Charge der Thrombokinase muß eine neue Eichkurve ermittelt werden (2). Man trägt die ermittelten Prothrombinzeiten der Verdünnungsreihen (Ordinate) gegen Prozent Plasmagehalt graphisch auf und erhält eine Hyperbel (Abb. 24), der man die Zwischenwerte entnimmt.

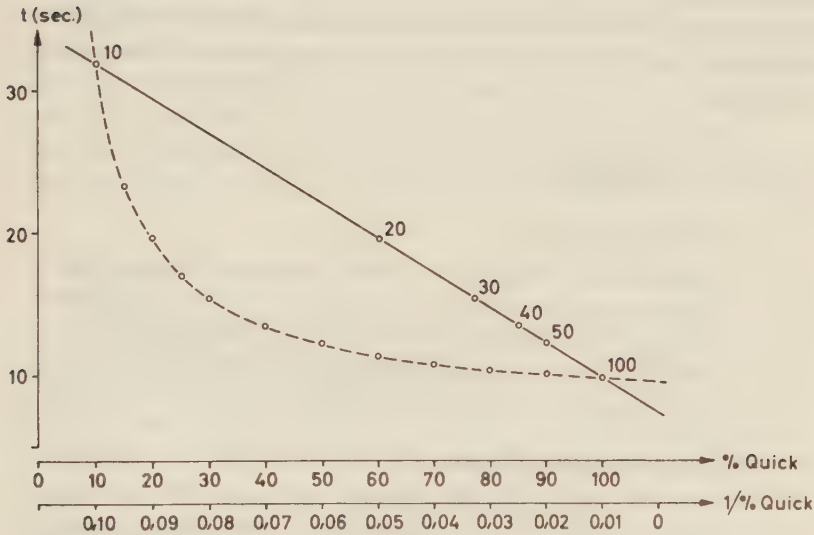


Abb. 24 : Eichkurve für die Bestimmung des Quickwertes bei direkter Auftragung als Hyperbel (o---o) und nach mathematischer Umformung in eine Gerade (o—o) (s. Text)

Der Quickwert einer Probe ist als Prozentgehalt an Normalcitratplasma derjenigen Verdünnungsstufe definiert, die die gleiche Prothrombinzeit aufweist.

2.6.1.2 Quickwert-Bestimmung mit dem Coagulation-Unimeter der Fa. Bio Dynamics Inc.

2.6.1.2.1 Prinzip:

In Polystyrol-Einmalküvetten wird zu einem Gemisch aus Calciumchlorid- und Thrombokinaselösung aus einer Marburgpipette Citratplasma hinzugefügt. Die Zeit zwischen Plasmazugabe und Gerinnungseintritt wird selbsttätig photometrisch gestoppt und digital auf Zehntelsekunden genau angezeigt.

2.6.1.2.2 Reagenzien:

1. Thrombokinas

Thromboplastinlösung "Roche" zur Bestimmung der Thromboplastinzeit. Inhalt ca. 5 ml. Aufbewahrung bei + 4° C im Kühlschrank. Nach Erwärmen auf 37° C im Wasserbad gebrauchsfertig. Erwärmt und geöffnet nur etwa 3 - 4 Std. haltbar.

2. Calciumchloridlösung 0,033 M :

3,70 g CaCl_2 (Merck 2083) werden in 1 l bidest. Wasser gelöst. Die Lösung wird filtriert und kurz aufgeköcht. Die Aufbewahrung erfolgt in sterilen 100-ml-Kölbchen bei + 4° C im Kühlschrank.

3. Gebrauchslösung:

5 ml Thromboplastinlösung und 5 ml Calciumchloridlösung werden in einem kleinen Polystyrolgefäß gründlich gemischt. Die Gebrauchslösung ist nur etwa 20 min stabil und daher rasch zu verbrauchen.

4. Sterile Natriumcitratlösung:

0,1 M Natriumcitratlösung wird am besten steril und pyrogenfrei aus der Apotheke in versiegelten Flaschen bezogen.

2.6.1.2.3 Gewinnung von Plasma

In eine 5-ml-Einmalspritze wird 1 ml 0,1 M Natriumcitratlösung luftblasenfrei aufgezogen. Mittels Einmalkanüle wird genau bis zur 5-ml-Marke luftblasenfrei Venenblut abgenommen. Nach Abnahme der Nadel wird sofort der Stempel der Spritze bis zum Anschlag herausgezogen und mit der entstandenen Luftblase der Inhalt gründlich gemischt. Dieser Schritt ist besonders wichtig, da sonst durch die zu geringe Citratkonzentration im vorderen Spritzenteil eine Teilgerinnung einsetzen kann, die einen zu niedrigen Quickwert vortäuschen würde. Im Labor wird aus dem Citratblut durch Zentrifugieren in Eppendorf-Mikrolitergefäßen bei 12000 x g Citratplasma gewonnen, aus dem der Quickwert bestimmt wird.

2.6.1.2.4 Arbeitsweise:

Das Coagulation-Unimeter und der 49 Küvetten fassende Zusatzthermostat werden etwa 20 min vor Gebrauch eingeschaltet. Die Betriebstemperatur von 37° C ist dann erreicht, wenn am Coagulation-Unimeter der die Kommastelle andeutende Leuchtpunkt aufhört zu flackern und am Zusatzthermostaten die gelbe Heizkontrollampe erlischt. Der Zusatzthermostat und der Thermoblock im Coagulation-Unimeter werden mit Einmalküvetten bestückt. Es ist günstig, die leeren Küvetten etwas vorzutemperieren, um eine gründliche Durchwärmung der Kunststoffwandung zu erzielen. In die angewärmten Küvetten pipettiert man mit einer Marburgpipette, bei großen Serien günstiger mit einer Hamilton-Spritze, je 200 µl Gebrauchslösung und wartet abermals 4 - 6 min, bis der Küvetteninhalt 37° C erreicht hat.

Der weitere Arbeitsablauf ist folgender:

1. Einbringen einer Küvette in die Meßposition, Abdecken mit der Pipettenhalterung. Lage und Form der Blende im Photometer sind so gewählt, daß die geringe Flüssigkeitsmenge ausreicht, um den Lichtweg voll auszufüllen.

2. Füllen einer 100 μ l-Marburgpipette mit Plasma und Einbringen der Pipettenspitze in die Pipettenhalterung. Die Pipettenspitze befindet sich jetzt etwa 4 mm über der Flüssigkeitsoberfläche der Küvette.
3. Knopf "Reset" drücken und drei Sekunden warten, bis der Leuchtpunkt an der Kommastelle der rechten Zählröhre aufleuchtet. Während dieser Zeit stellt sich das Gerät auf die Ausgangsextinktion der Gebrauchslösung ein.
4. Rasches Niederdrücken des Pipettenhubknopfes und Entnahme der Pipette aus der Halterung. Im Augenblick des Durchmischens von Serum und Gebrauchslösung beginnen die Zählröhren den Zeitablauf in Schritten von Zehntelsekunden anzuzeigen. Bleibt die Zeitanzeige stehen, so ist Gerinnung eingetreten.
5. Zeit ablesen und der Eich-tabelle den zugehörigen Quickwert entnehmen. Die Zählröhren zeigen die gestoppte Zeit so lange an, bis - im Rahmen einer neuen Messung - wieder der Knopf "Reset" gedrückt wird. Nach dem Start ist das Gerät etwa 6 - 7 sec lang für Extinktionsänderungen unempfindlich, um zu vermeiden, daß eventuell durch Einspritzen des Plasmas entstandene und zerplatzende Luftblasen eine Fehlmessung verursachen.

2.6.1.2.5 Eichung:

Um einen Vergleichsmaßstab für die Gerinnungsfähigkeit eines Plasmas mit dem Normalwert zu erhalten, wurden verschiedene Auswertmethoden vorgeschlagen. Am besten bewährt hat sich die Methode nach Quick. Definitionsgemäß wird hierbei die mittlere Gerinnungsfähigkeit der Citratplasmen eines Normalkollektivs gleich 100 Prozent gesetzt (- diese 100 Prozent sind also nicht die absolute obere Grenze, sondern ein Mittelwert). Man mißt die Thromboplastinzeiten eines Normalkollektivs von etwa 15 bis 20

gesunden Männern und errechnet Mittelwert und Standardabweichung. Von 2 oder 3 Plasmen, deren Thromboplastinzeiten im $\bar{x} \pm s$ - Bereich liegen (siehe Anmerkung 1), stellt man sich mit Marburgpipetten folgende Verdünnungsreihe her (Verdünnungslösung: 1 Teil 0,1 M Na Citratlösung + 4 Teile 0,9 %ige Kochsalzlösung) :

% Citratplasma	100	90	80	70	50	25	10
Citratplasma/ul	500	450	400	350	200	100	50
Verd. Lösg./ul	0	50	100	150	200	300	450

Definitionsgemäß wird nun der Prozentgehalt an Citratplasma jeder Verdünnungsstufe gleich Prozent Gerinnungsfähigkeit von Normalplasma gesetzt. Man mißt die Prothrombinzeiten der einzelnen Verdünnungsstufen in Dreifachbestimmungen (siehe Anmerkung 2) und mittelt die Ergebnisse. Trägt man die gestoppten Zeiten gegen den Prozentgehalt an Citratplasma graphisch linear auf, so erhält man eine Hyperbel, die der Gleichung $t = b/\%PI + a$ gehorcht. Trägt man die Zeiten jedoch gegen den reziproken Wert der Verdünnung auf, so erhält man eine Gerade. Die Konstanten a und b sind jetzt leicht zu ermitteln und damit jeder gewünschte Punkt der Kurve. Um dieses Verfahren möglichst einfach zu gestalten und eine Tabelle mit optimal genauen Zwischenwerten zu erhalten, wurden für den Tischrechner "Olivetti Programma 102" zwei Programme entwickelt (siehe unten). Das Programm A dient der Ermittlung der Werte a, a/b, b und des Korrelationskoeffizienten der Meßpunkte jeder einzelnen Verdünnungsreihe. Für die Berechnung der Eich-tabelle mit dem Programm B werden die Mittelwerte von a und b aus den Verdünnungsreihen der drei Citratplasmen in zwei Speicher des Rechners eingegeben, der daraufhin die Tabelle in Einprozentschritten von 100 % bis 10 % mit den zugehörigen Zeiten ausdruckt.

NB: Die einzelnen Chargen Thromboplastin sind in ihrer Aktivität nicht gleich. Man bestellt am besten die für ein halbes Jahr ausreichende Menge Thrombokinase von einer Chargennummer und erstellt dann jedesmal eine neue Eichkurve.

2.6.1.2.6 Anmerkungen:

1. Die Prothrombinzeit eines zur Eichung verwendeten Plasmas sollte bei dieser Methode etwa zwischen 10,5 und 11,2 liegen.
2. Obwohl das Gerät hervorragende Doppelwerte liefert, sollte man jedoch nicht auf Doppelbestimmungen verzichten, schon um Pipettierfehler, unsaubere Küvetten und Verschleppungsfehler zu erkennen.
3. Das Serum wird bei dieser Methode nicht vortemperiert. Da ein Drittel Serum (ca. 22°C) zu zwei Drittel temperierte Gebrauchslösung (37°C) in eine ebenfalls temperierte Küvette gebracht werden, ist die Endtemperatur nicht sehr von 37°C unterschieden. Wie Vorversuche gezeigt haben, ist - abgesehen von dem zusätzlichen Arbeits- und Materialaufwand - der Fehler durch ein versehentlich unterschiedlich langes oder zu langes Vortemperieren der Plasmaproben auf 37°C wesentlich größer, als wenn man von vornherein darauf verzichtet, zumal die Eichkurve auf die gleiche Weise erstellt wird.
4. Zur täglichen Kontrolle der Methode im Sinne einer Präzisionskontrolle wird empfohlen, täglich eine Flasche eines käuflichen Kontrollplasmas zu öffnen und die Prothrombinzeit des 100 %-Wertes und des 20 %-Wertes (Marburgpipetten : $100\text{ }\mu\text{l}$ Plasma + $400\text{ }\mu\text{l}$ 0,02 M Natriumcitratlösung) in doppeltem Ansatz zu messen. Die Daten sollten statistisch ausgewertet werden. Diese Methode gibt besonders bei Bezug einer neuen Charge Thromboplastin wertvolle Hinweise auf deren Aktivität.
5. Die beim Einspritzen des Plasmas in die Küvette in der Pipettenspitze verbleibende Menge (Pipettierfehler) ist, wie Serienbestimmungen zeigen, sehr konstant. Der Fehler dürfte durch die Eichung nach der gleichen Methode eliminiert sein.

2.6.1.2.7 Rechenprogramme:

Die Programme sind auf einer Magnetkarte gespeichert.
Sie wurden von Herrn Dr.med. K. HORN entwickelt.

Programm A : Man setzt $\frac{1}{\% \text{ Quick}} = x$ und erhält $t = b \cdot x + a$.

Die Steigung b der Regressionsgeraden errechnet sich aus möglichst vielen Werten für t (Prothrombinzeit) und x (1/% Verdünnung) nach der Gleichung:

$$b_{tx} = \frac{\sum (x_i \cdot t_i - \bar{x} \cdot \bar{t})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

Für $x = 0$ errechnet sich der Schnittpunkt a mit der Ordinate;

für $t = 0$ der Schnittpunkt $\frac{a}{b}$ mit der Abszisse.

Zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten r wurde folgende Gleichung in das Rechenprogramm gespeichert:

$$r = \frac{\sum (x_i \cdot t_i - \bar{x} \cdot \bar{t})}{\sqrt{[\sum (x_i - \bar{x})^2] \cdot [\sum (t_i - \bar{t})^2]}}$$

Programm B : Hier rechnet man günstiger mit der Hyperbel-formel der Eichkurve:

$$y = \frac{b}{x} + a \quad \text{oder in diesem Fall:} \quad t = \frac{1}{\% \text{ Quick}} + a$$

Mit Hilfe eines bedingten Sprunges werden alle ganzzahligen Werte für % Quick und die dazugehörigen Prothrombinzeiten automatisch errechnet und ausgedruckt.

2.6.2 ERGEBNISSE

Aus Rationalisierungsgründen (s.o.) wird mit einem Blut-Citrat-Verhältnis von 4 zu 1 und nicht, wie üblich, von 9 zu 1 gearbeitet (2, 108). Es zeigte sich, daß bei einer Recalcifizierung mit 0,025 M Calciumchloridlösung, wie für die 9 : 1 Verdünnung vorgesehen, die Calciumkonzentration nicht ausreicht.

Die Abbildung 25 zeigt die gemittelte Abhängigkeit der Prothrombinzeit von der Calciumionenkonzentration für 100 % und 20 % Quick-Wert. Das Optimum findet man bei Verwendung einer 0,033 M Calciumchloridlösung. Das ist besonders bei der Erstellung der Eichkurven bedeutsam. Verdünnt man nämlich wie üblich mit physiologischer Kochsalzlösung, so stehen einer abnehmenden Citratmenge der Plasmaverdünnung gleichbleibende Mengen an Calciumionen gegenüber, was zu einer steigenden Konzentration an freien Calciumionen in der Küvette führt. Nach Abb. 25 verändert das aber die Prothrombinzeiten. Verwendet man statt physiologischer Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel 0,02 M Na-Citrat in 0,9 %iger NaCl-Lösung, so ist in jeder Verdünnungsstufe die gleiche Menge an Citrat und damit auch an freien Calciumionen. Auf diese Weise vermeidet man, daß Verdünnungen von 80 oder 90 % kürzere Prothrombinzeiten als der 100 %-Wert haben und außerhalb der Eichkurve liegen.

Die pH-Werte von 32 mit einer Blutmeßkette bei 37° C gemessenen Citratplasmen (1 : 4) lagen zwischen 7,64 und 7,98 ($\bar{x} = 7,78$; $s = 0,09$), auch wenn die Citratlösung auf pH = 7,4 eingestellt wurde. Blut-pH, Pufferkapazität und endogenes Calcium dürften die für diese recht erheblichen Abweichungen entscheidenden Veränderlichen sein. Löst man das für die Blutentnahme benutzte Na-Citrat nicht in Wasser, sondern in 0,2 M Tris/HCl-Puffer, so läßt sich damit der Plasma-pH-Wert einstellen. Durch Parallelbestimmung bei pH-Werten zwischen 7,3 und 8,0 konnte ein sehr schwach ausgeprägtes pH-Optimum der Prothrombinzeit zwischen 7,4 und 7,5 festgestellt werden. Demnach wirkt sich der Einfluß des von Probe zu Probe schwankenden pH-Wertes nicht

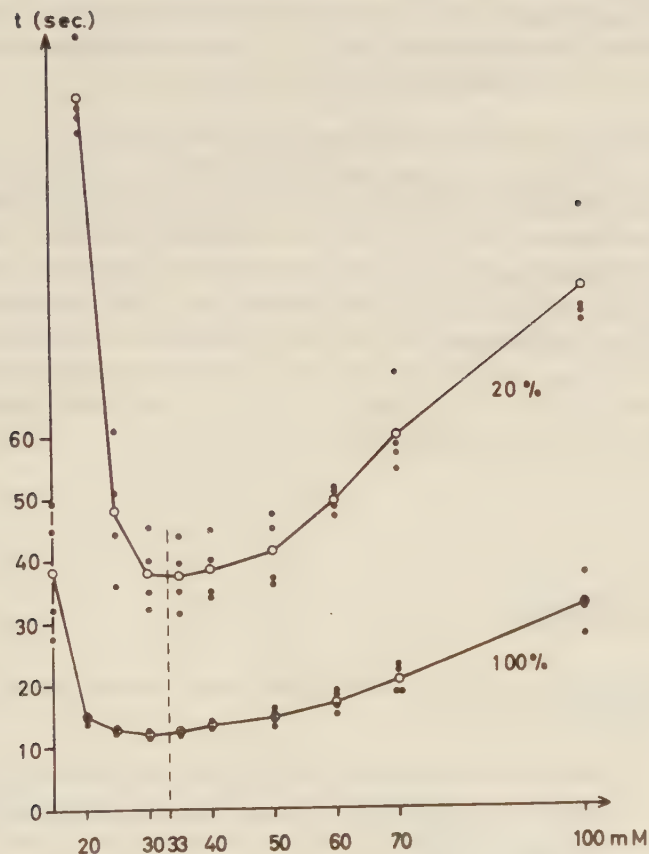


Abb. 25 : Abhängigkeit der Prothrombinzeit des Normalwertes (ca. 100 % Quick) und therapeutischer Werte (ca. 20 % Quick) von der Calciumionenkonzentration.
 Ordinate: Prothrombinzeit.
 Abszisse: Millimolarität der zur Recalcifizierung verwendeten CaCl_2 -Lösung (o—o Mittelwerte aus je vier Plasmen).

entscheidend auf den Quick-Wert aus. Die Verwendung einer gepufferten Natriumcitratlösung erscheint unnötig.

Wie erwähnt, hat die Quick-Eichkurve die Form einer Hyperbel und läßt sich als Gerade darstellen, wenn man die gefundenen Prothrombinzeiten (t) gegen die reziproken Werte der Verdünnungen aufträgt (Abb. 24).

Durch die Verwendung der Computerprogramme (s. 2.6.1.2.7) war es uns leicht möglich, die Korrelationskoeffizienten der Meßwerte aus den letzten 12 Eichkurven der Handmethode zu errechnen. Es fand sich ein erstaunlich hoher Mittelwert von $\bar{r} = 0,9975$ bei einer Standardabweichung von $s = 0,0017$. Für ebenfalls 12 willkürlich ausgewählte Eichkurven, die mit dem Coagulation-Unimeter erstellt waren, errechnete sich ein mittlerer Korrelationskoeffizient von $\bar{r} = 0,9990$, $s = 0,0012$, welcher erkennbar besser als der der Handmethode ist.

2.6.3 DISKUSSION

2.6.3.1 Nachteile der klassischen Arbeitsweise nach Quick sind:

1. Körperliche Anstrengung: Eine Assistentin sitzt mit über Kopfhöhe erhobenem Arm vor dem Wasserbad, um das Glashäkchen durch das Gerinnungsgemisch zu ziehen.
2. Individuelle Verschiedenheiten der Stoppzeiten erfordern, daß jede Assistentin ihre eigene Eichkurve erstellt.
3. Der Zeitaufwand der Methode bedingt, daß die letzten Quickwerte manchmal erst vier Stunden nach Blutentnahme bestimmt werden können, was zu falsch niedrigen Werten führt.

2.6.3.2 Demgegenüber hat die elektro-optische Methode folgende Vorteile:

1. Denkbar einfache Handgriffe, die auch von ungeübtem Personal und im Nachtdienst schnell und sicher ausgeführt werden können.
2. Einmal-Gefäße, keine Spülarbeit.
3. Keinerlei körperliche Anstrengung der Assistentin.
4. Rationellere und schnellere Verarbeitung des Untersuchungsgutes.
5. Vermeidung der individuellen Beobachtungsungenauigkeit.

3 DISKUSSION, ZUSAMMENFASSUNG,
LITERATUR

3.1 Diskussion

Für die Qualitäts-Kontrolle im Klinisch-Chemischen Laboratorium gibt es ein breites Spektrum von Lösungen, welches vom Minimal-Programm, also einer einfachen Präzisions-Kontrolle, bis zum Optimum der Kontrolle reicht. Ein optimales Qualitäts-Kontrollprogramm könnte z.B. so aussehen, daß die Präzision in jeder Serie und die Richtigkeit in jeder vierten Serie überprüft wird. Man kann bei der Einschleusung der Proben zur Überprüfung von Präzision und Richtigkeit verdeckt, d.h. ohne Wissen der Technischen Assistentin, arbeiten oder man kann die Kontrolle, als solche gekennzeichnet, dem Analysengang einfügen. Die Einschleusung von unerkannten Kontroll-Proben verschiedenster Form ist natürlich das aufwendigere Vorgehen. In der täglichen Laboratoriums-Praxis wird der Aufwand für die Qualitäts-Kontrolle einmal durch die damit verbundenen Unkosten und zum zweiten durch die aus ihr resultierende Mehrarbeit begrenzt. Praktische Kompromisse der Qualitäts-Kontrolle sehen daher z.B. so aus, daß täglich einmal die Richtigkeit und die Präzision überprüft werden.

Will man sich über die Wirksamkeit dieser Qualitäts-Kontrolle orientieren, so bietet sich ein verhältnismäßig einfaches statistisches Verfahren an, das keine zusätzliche analytische Arbeit erfordert. Aus den Normalergebnissen eines Tages läßt sich ein täglicher "Mittelwert der Normalen" ("average of normals") berechnen. Vorausgesetzt, daß diese Berechnung nur für jene Methoden vorgenommen wird, die das Minimum von mindestens 30 normal ausgefallenen Ergebnissen pro Tag liefern, ist eine Schwankung von Tag zu Tag verhältnismäßig gering. Die Berechnung dieses "average of normals" läßt eine Form der Qualitäts-Kontrolle zu, bei welcher einmal die den Technischen Assistentinnen mehr oder weniger bekannten Werte der Präzisions- und Richtigkeits-Kontrolle überprüft werden und zum zweiten die Möglichkeit besteht, neben den Analysefehlern (Abbildung 6) auch zusätzlich systematische Feh-

ler der Probennahme und Proben-Verwahrung zu erfassen. Bis zu einem gewissen Grad läßt das "average of normals" es zu, die Größe eines systematischen Fehlers an einem gegebenen Tage anzugeben und die Ergebnisse zu korrigieren, sofern eine Wiederholung sämtlicher Analysen nicht möglich ist. Der praktische Wert der verschiedenen Formen der Qualitäts-Kontrolle (Präzisions-Kontrolle, Richtigkeits-Kontrolle und "average of normals") wurde im Ergebnisteil für verschiedene Methoden dargestellt.

Der große Wert einer Qualitäts-Kontrolle im Klinisch-Chemischen Laboratorium liegt darin, daß sowohl im Labor als auch bei den Ärzten der versorgten Klinik eine quantitativere Vorstellung über die Qualität der erhaltenen Ergebnisse erzeugt wird. Die Darstellung der Qualitäts-Kontrolle in Form von Kontrollkarten (Abb. 5) erlaubt es jedem Interessierten, zu erfahren, wie groß der akzeptierte Fehler einer Methode ist, oder umgekehrt, wie genau das individuelle erhaltene Ergebnis ist. Durch Offenlegung der Kontrollldaten der Analytik steigt das Vertrauen der Bezieher der Ergebnisse ebenso wie das der mit der Analytik Beschäftigten. Auf diese Weise lassen sich viele unnötige Wiederholungsuntersuchungen vermeiden und die Kosten für diagnostische Verfahren senken.

Ein großer Teil der in dieser Arbeit mitgeteilten Ergebnisse hängt mit der Automatisierung verschiedenster Verfahren und der Rationalisierung der eigentlichen Labor-Methoden zusammen. Durch die Größe des täglichen Untersuchungsgutes einerseits und durch die von der Klinik-Verwaltung ermöglichten Investitionen andererseits ist der hier gefundene methodische Kompromiß bedingt. Eine Automatisierung des Analysenganges war nur für sehr wenige Verfahren möglich. Obwohl nach der Zahl der Untersuchungen (s. Einleitung) weitere Automatisierungen durchaus wünschenswert wären (Abb. 7), hat die hier vorliegende Situation ihren Vorteil insofern, als ein Laboratorium dieser Größe, in dem neben manuellen auch automatisierte Verfahren praktiziert werden, als Lehrlabor für die Ausbildung in der Praxis noch ungeübter junger Assistentinnen

geeignet ist. Dabei dürfte das Schwergewicht auf dem Erlernen des fehlerfreien Umgangs mit Volumina im Mikrolitermaßstab liegen.

Einen neuen Aspekt bringt die Forderung, Laborautomaten richtig zu bedienen, fachmännisch zu warten und zu pflegen, Fehler und Defekte aufzuspüren und kleinere Reparaturen selbst auszuführen. Auch hier kann die Herstellung von Lehrfilmen im Schmalfilmformat hervorragende Dienste leisten.

3.2 Zusammenfassung

1. Die anfängliche Situation der Laboratorien für Klinische Chemie der II. Medizinischen Klinik wurde bezüglich der bestehenden Methoden analysiert und die jährliche Zunahme der Analysen-Frequenz ermittelt.
2. Die üblichen Methoden der Qualitäts-Kontrolle (Präzision, Richtigkeit, Ringversuche) wurden eingeführt und bezüglich ihrer Wirksamkeit durch tägliche statistische Berechnung eines Mittels der Normwerte für verschiedene Methoden ("average of normals") geprüft. Dieses Verfahren ist wenig verbreitet und hat sich bei uns als wertvolle Bereicherung der Möglichkeiten der Qualitäts-Kontrolle herausgestellt.
3. Die Arbeit enthält zahlreiche Vergleiche bisher in diesem Laboratorium üblicher Verfahren (z.B. Milliliter-Methoden) mit im Rahmen dieser Arbeit neu eingeführten modernen Methoden (z.B. Mikroliter-Technik), die den methodischen Fortschritt hinsichtlich Genauigkeit, Spezifität, Kosten und Arbeitsaufwand erkennen lassen.
4. Für einzelne Methoden wurden analytische Probleme spezieller bearbeitet. So war es z.B. erforderlich, die Optima für Ca^{++} -Ionenkonzentration und pH bei der Bestimmung der Prothrombinzeit zu ermitteln, und zwar im Rahmen der Einführung eines rationelleren, photoelektrischen Verfahrens.

3.3 L I T E R A T U R

- 1 AMELUNG, D. und H. D. HORN : Fermentaktivitätsbestimmung im Serum bei Herzinfarkt. Dtsch. Med. Wschr. 81, 1701 (1956).
- 2 AVERDUNK, R. und K. BORNER : Korrelation der Thromboplastinzeit bei Dicumarol-behandelten Patienten unter Verwendung verschiedener Thrombokinaspräparate. Z.klin.Chem. 8, 263 (1970).
- 3 BARMAN, T. E. : Enzyme handbook. Vol. I, II. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1969
- 4 BARTELS, H und M. BÖHMER : Eine empfindliche Methode zur Bilirubinbestimmung. Z.klin.Chem. 7, 444 (1969).
- 5 BESSEY, O. A., O. H. LOWRY and M. J. BROCK : A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. J. Biol. Chem. 164, 321 (1946).
- 6 BEYERMANN, K., W. GEROK und V. GROTH : Zur Präzisierung der Kreatininbestimmung. Vergleich verschiedener Bestimmungsverfahren. Klin. Wschr. 45, 950 (1967).
- 7 BLOCH, A. : Das Cholesterin bei der Liebermann-Burchardschen Farbereaktion. Biochem. Z. 257, 171 (1933)

8 BLOOR, W.R. : The determination of cholesterol in blood. J.Biol.Chem. 24, 227 (1916).

9 BOCK, H.E. und M. EGGSTEIN : Automatisationsprobleme in der Medizin. Dtsch.Med.Wschr. 93, 985 (1968)

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH - Firmendruckschriften
(Biochemica-Abteilung) :

10 Berechnung von Substratkonzentrationen und Enzymaktivitäten.

11 Bestimmung von Creatinin im Serum und Harn. Auflage 1968

12 Cholesterin-Mikrolitermethode, Auflage 1969

13 Bilirubin-Mikrolitermethode, Auflage 1969

14 Bestimmung der Aktivität der GOT
2. Auflage 1970

15 Bestimmung der Aktivität der GPT
2. Auflage 1970

16 Bestimmung der Aktivität der Laktadehydrogenase im Serum - UV-Test mit NADH.
2. Auflage 1966

17 Bestimmung der Aktivität der LDH-1-Isoenzyme, Auflage 1969.

18 Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum. 2. Auflage 1966

- 19 Bestimmung der Aktivität der sauren Phosphatase im Serum. 2. Auflage 1966.
- 20 Mikrolitermethode - LAP. Auflage 1969
- 21 BONITZ,K. und J.FÜHR : Laboratoriums-Schnelldiagnose der Niereninsuffizienz in der Praxis und im Krankenhaus. Therapie d. Gegenwart 102, 810 (1963).
- 22 BORNER,K., W. FABRICIUS und B. MAROWSKI : Statistische Qualitätskontrolle mit Rinderserum als Untersuchungsmaterial. Z.klin.Chem. 8, 170 (1970).
- 23 BRAUER,G. : Handbuch der präparativen anorganischen Chemie. Bd.I und II. Ferd. Encke Verlag, Stuttgart 1962.
- 24 BRIESKORN,C.H. und H.HOFFMANN : Beitrag zum Chemismus der Farbreaktion nach Liebermann-Burchard. Arch.Pharm. 297, 577 (1964).
- 25 BROCK,N., H.-J.HOHRST, B.SCHNEIDER und G. SIEMS: Bestimmung der sauren und alkalischen Serumphosphatasen als Routinemethode. Arzneimittelforschung 14, 757 (1964).
- 26 BRUNNER,G., J.SOMMER,und R.KATTERMANN : Über das Verhalten der sogenannten Leucin-Aminopeptidase (LAP) im Serum unter Verwendung verschiedener Substrate. Klin.Wschr. 46, 541 (1968)

- 27 BRUNS, F.H. : Über Esterasen, Nukleasen, glycolytische Fermente und Transaminasen des Blutserums. Clin.chim.Acta, Amsterdam 2, 257 (1957).
- 28 BÜTTNER, H. : Statistische Qualitätskontrolle in der klinischen Chemie. Z.klin.Chem. 5, 41 (1967).
- 29 BÜTTNER, H. und D.STAMM : Qualitätskontrolle klinisch-chemischer Untersuchungen. Z.klin.Chem 4, 303 (1966).
- 30 BURCHARD, H. : Beiträge zur Kenntnis des Cholesterins. Inauguraldissertation, Universitätsbuchdruckerei Adler's-Erben, Rostock, 1889.
- 31 CASE, F.H. : Substituted 1,10-phenanthroline. V. Phenylderivates. J.Org.Chem. 16, 1541-5.
- 32 CONSRUCH, U. und H. KOUFEN : Der Beitrag der Liquorelektrophorese zur klinischen Diagnostik. Dtsch.Med.Wschr. 93, 2168 (1968)
- 33 COUNCIL ON CLINICAL CHEMISTRY of the American Society of clinical Pathologists : Quality control manual. Überarbeitete Auflage, 1962.
- 34 DIRR, K. : Quantitatives Arbeiten in der Klinik. 3. Aufl. 1951. Verlag Rudolf Müller und Steinicke, München.

- 35 DOERR, P. und D. STAMM : Methodenvergleich der Gesamteiweißbestimmung im Serum.
Z.klin.Chem. 6, 304 (1968).
- 36 EBERHAGEN, D. : Betrachtungen zur Bestimmung des Cholesterins im klinisch-chemischen Laboratorium. Z.klin.Chem. 7, 167 (1969).
- 37 EDWARDS, O.M., R.I.S. BAYLISS and S. MILLEN :
Urinary creatinine excretion as an index of the completeness of 24-hour urine collections.
Lancet (1969) II, 1165.
- 38 EISENBURG, J. : Die klinische Bedeutung der Laktatdehydrogenasen.
Dtsch.Med.Wschr. 94, 1882 (1969).
- 39 ELLIOT, B.A. and J.H. WILKINSON : The "serum - hydroxybutyrat dehydrogenase" in diseases other than myocardial infarction.
Clin.Sci. 24, 343 (1963).
- EPPENDORF HAMBURG (Netheler und Hinz), Firmendruckschriften :
- 40 Kreatinin im Serum Nr. AV 1161 MV
- 41 Harnsäure im Serum Nr. AV 800 MV
- 42 Gesamtcholesterin im Serum II. Nr. AV 330 MV.
- 43 Direktes und indirektes Bilirubin im Serum. Nr. AV 241 MV.

- 44 Anorganischer Phosphor im Serum.
Nr. AV 1630 MV.
- 45 Eisen im Serum. Nr. AV 521 MV
- 46 Glucose im Blut. Nr. AV 700 MV.
- 47 Harnstoff im Serum (Berthelot Reaktion).
Nr. AV 832 MV.
- 48 Bestimmung der GOT-Aktivität im Serum.
Nr. AV 721 MV.
- 49 Bestimmung der GPT-Aktivität im Serum.
Nr. AV 731 MV.
- 50 Bestimmung der Aktivität der LDH im
Serum. Nr. AV 1200 MV.
- 51 Alkalische Phosphatase im Serum,
Kinetischer Test. Nr. AV 1655 MV.
- 52 Saure Phosphatase im Serum.
Nr. AV 1660 MV.
- 53 FINTELMANN,V.: Laboratoriumsmethoden zur Diagnose
des Eisenmangels.
Dtsch.Med.Wschr. 94, 1244 (1969).
- 54 FISHMAN,W.H. and F. LERNER : A method for
estimating serum acid phosphatase of
prostatic origin.
J.Biol.Chem.,200, 89 (1953).
- 55 FISKE,C.H. and Y.SUBBARROW: The colorimetric
determination of Phosphorus. J.Biol.

- Chem. 66, 375 (1925).
- 56 FISKE, C.H. and Y. SUBBARROW: Phosphocreatine.
J. Biol. Chem. 81, 629 (1929).
- 57 FLORKIN, M. and E.H. STOTZ: Report of the
Commission on enzymes of the IUB.
Comprehensive Biochemistry 13, 6 (1964).
- 58 FLYNN, F.V.: Computer-assisted processing of
biochemical test data. p.46.
Proceedings of a one-day-symposium on
progress in medical computing, Jun 2,
1965 (Elliot Medical Automation, 34
Portland Place London W1).
- 59 FOLIN, O.: On the determination of creatinine
and creatine in blood, milk and tissues.
J. Biol. Chem. 17, 475 (1914).
- 60 FOLIN, O.: The preparation of sodium tungstate
free from molybdate, together with a
simplified process for the preparation
of correct uric acid reagent (and some
comments).
J. Biol. Chem. 106, 311 (1934).
- 61 FOLIN, O.: Standardized Methods for the deter-
mination of uric acid in unlaced blood
and urine.
J. Biol. Chem. 101, 111 (1934).
- 62 FOLIN, O.: Bemerkungen zur Bestimmung von Krea-
tinin (und Kreatin) im Blut. Hoppe-
Seylers Z. phys. Chem. 228, 268 (1934).

- 63 FOLIN,O. and V.CIOCALTEU : On tyrosine and
tryptophane determinations in proteins.
J.Biol.Chem. 73, 627 (1927).
- 64 FOLIN,O. and W.DENIS : A new (colorimetric) me-
thod for the determination of uric acid
in blood.
J.Biol.Chem. 13, 469 (1913).
- 65 FRIED,R. und J.HOEFLMAYR : Vereinfachte Methode
zur Bestimmung der veresterten Fett-
säuren im Serum.
Klin.Wschr. 41, 727 (1963).
- 66 GALIETTI,F. : A simplified procedure for the co-
lorimetric determination of serum ester-
ified fatty acids.
Clin.Chim.Acta 6, 749 (1961).
- 67 GEIGY BASEL : Wissenschaftliche Tabellen.Docu-
menta Geigy. 7.Auflage, 1968.
- 68 GEIGY BASEL : Beeinflussung der Blutgerinnung
und der Wirkung oraler Antikoagulantien
durch exogene und andere Faktoren.
Firmendruckschrift.
- 69 GLICK,D. : Methods of biochemical analysis.
Vol.17 Interscience Publishers, New York,
1969.
- 70 GLICK,D : Methods of biochemical analysis.
Vol.3.Interscience Publishers, Inc. New
York, 1956.

- 71 GRABENER, E. : Vergleichsuntersuchungen zur Harnstoffbestimmung mittels eines Urease-Teststreifens.
Dtsch. Med. Wschr. 17, 907 (1963).
- 72 GRASSMANN, W. und K. HANNIG : Beiträge zur Methodik der papierelektrophoretischen Serumanalyse.
Klin. Wschr. 32, 838 (1954).
- 73 GREENWALD, I. : The chemistry of JAFFE's reaction for creatinine.
J. Biol. Chem. 86, 333 (1930).
- 74 GRIESSER, G. und G. WAGNER : Automatisierung des klinischen Laboratoriums. - Dokumentation und Statistik von Laboratoriumsergebnissen und medizinisch-technischen Daten. F.K. Schattenhauer-Verlag Stuttgart-New York, 1968.
- 75 GUNDLACH, G. : Die automatische Kreatinbestimmung mit Hilfe der Diacetylreaktion.
Z. klin. Chem. 6, 415 (1968).
- 76 HAAS, H. G. : Knochenstoffwechsel und Parathyreoideaerkrankungen. Georg Thieme Verlag - Stuttgart, 1966.
- 77 HARDING, U. und G. HEINZEL : Vollautomatische Bestimmung des Blutzuckers nach der Hexokinase-Methode.
Z. klin. Chem. 7, 640 (1969).

- 78 HAUSAMEN, T.K., W.RICK, W.GROSS and R.HELGER :
Optimal conditions for the determination of serum alkaline phosphatase by a new kinetic method.
Clin.Chim.Acta 15, 241 (1967).
- 79 HEILMEYER, L. und W.KREBS : Bestimmung der Harnsäure im Blutserum mit dem Zeiss'schen Stufenphotometer unter besonderer Berücksichtigung der optischen Grundlagen. Biochem.Z. 223, 365 (1930).
- 80 HERRMANN, R. und C.TH.J.ALKEMADE : Flammenphotometrie, 2. Aufl.Springer-Verlag, Göttingen-Heidelberg, 1960.
- 81 HOEFELMAYR, J. und R.FRIED : Vereinfachte klinisch-chemische Laboratoriumsbestimmungen (photometrische Methoden). Therapie d. Gegenw. 104, 354 (1965).
- 82 HOFFMANN, R.G. and M.E.WAID : The number plus method of quality control of laboratory accuracy.
Am.J.Clin.Path. 40, 263 (1963).
- 83 HOFFMANN, R.G. and M.E.WAID : The 'average of normals' method of quality control. Am. J.Clin.Path. 43, 134 (1965).
- 84 HOFFMANN, W.S. : A rapid photoelectric method for the determination of glucose in blood and urine. J.Biol.Chem. 120, 51 (1937).
- 85 HORN, H. und D.AMELUNG : Die Bedeutung von Transaminasen- und Milchsäuredehydrogenase-Bestimmungen im Serum bei Leber-

erkrankungen.

Dtsch.Med.Wschr. 82, 619 (1957).

- 86 IWIG, M.D. GLÄSSER und H. HANSON : Eignung der "klassischen" Leucinaminopeptidase (LAP) als Indikatorenzym bei Hepatitis epidemica acuta. (Differenzierung zwischen Leucinaminopeptidase und Arylamidase bei hepatobiliären Erkrankungen. Z.klin.Chem. 7, 225 (1969).
- 87 JENDRASSIK, L. und R.A. CLEGHORN : Photometrische Bilirubinbestimmung. Biochem.Z. 289, 1 (1937).
- 88 JENDRASSIK, L. und P. GROF : Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Bilirubins. Biochem.Z. 297, 81 (1938).
- 89 JÖSCH, W. und U.C. DUBACH : Einfluss der Diurese auf die Enzymurie. Clin.Chim Acta 15, 325 (1967).
- 90 KARLSON, P. : Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1966.
- 91 KARMEN, A. : A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood serum. J.Clin.Invest. 34, 131 (1955).
- 92 KARMEN, A., WROBLEWSKI, F. und J.S. LA DUE : Transaminase activity in human blood. J.Clin.Invest. 34, 126 (1955).

- 93 KATTERMANN, R. : Zur Bestimmung des Kreatinins bei Ketonämie.
Z.klin.Chem. 5, 72 (1967).
- 94 KELLER, H., W. MÜLLER-BEISSENHIRTZ und E. NEUMANN :
Bestimmung der Eiweiß-Konzentration im Liquor cerebrospinalis. Kritik der Methoden. D.Med.Welt 20 N.F.1969, Nr. 23, 7.VI.
- 95 KERN, A. und E. STRANSKY : Beitrag zur kolorimetrischen Bestimmung der Harnsäure.
Biochem.Z. 290, 419 (1937).
- 96 KIBRICK, A.C. and M. BLONSTEIN : Fractionation of serum into albumin and alpha-, beta- and gamma-globulin by sodium sulfat.
J.Biol.Chem. 176, 983 (1948).
- 97 KIM, K.E., G. ONESTI, D. RAMIREZ, A.N. BREST and C. SWARTZ :
Creatine clearance in renal disease. A reappraisal. British Med.J. 4, 11 (1969).
- 98 KING, E.J. and D.M. CAMPBELL : International enzyme units, an attempt at international agreement.
Clin.Chim.Acta 6, 301 (1961).
- 99 KNEDEL, M., H. KRECH und H. KIRZEDER : Apparative Möglichkeiten zur Durchführung klinisch-chemischer Analysen.
Z.klin.Chem. 7, (1969).

- 100 KRÄTZSCHMAR, M. : Über die Beziehung zwischen Serum- und Liquorproteinen, insbesondere Gammaglobulinen bei Dys- und Paraproteinämien.
Dissertation Universität München, 1967.
- 101 LA DUE, J.S., F.WROBLEWSKI and A.KARMEN :
Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction.
Science 120, 497 (1954).
- 102 LAUDAHN, G., E.HARTMANN, E.M.ROSENFELD, H.WEYER und H.W.MUTH : Normalwerte der Serumtransaminasen bei Verwendung substrat-optmierter Testansätze zur Aktivitätsmessung. Untersuchungsergebnisse bei 3979 klinisch gesunden Werktätigen beiderlei Geschlechts.
Klin.Wschr. 48, 838 (1970).
- 103 LEDLEY, R.S. : Use of computers in biology and medicine. New York 1965.
- 104 LINSS, G., E.EGGER und B.MALLMANN : Normalwerte für das endogene Serumkreatinin nach der Standardmethode DAB 7.
D.Deut.Gesundheitswesen 25, 20 (1970).
- 105 LOHMANN, K. und L.JENDRASSIK : Kolorimetrische Phosphorsäurebestimmung im Muskelextrakt.
Biochem.Z. 178, 419 (1926).
- 106 LOWRY, O.H., N.J.ROSEBROUGH, A.L.FARR and R.J.RANDALL : Protein measurement with the

FOLIN phenol reagent.

J.Biol.Chem. 193, 265 (1951).

- 107 LUKASIK,S., R.RICHTERICH und I.P.COLOMBO :
Der diagnostische Wert der alkalischen
Phosphatase, der Leucinaminopeptidase
und der γ -Glutamyl-Transpeptidase bei
Erkrankungen der Gallenwege.
Schweiz.Med.Wschr. 98, 81 (1968).
- 108 MARX,R. : Hämostaseologie. Habilitationsarbeit,
Universität München, 1953.
- 109 MARX,R. und H.BAYERLE : Über die Bestimmung
der Prothrombinzeit in kleinen Mengen
Kapillarblut.
Z.Physiol.Chem. 283, 243 (1948).
- 110 MATTENHEIMER,H. : Mikromethoden für das kli-
nisch-chemische und biochemische La-
boratorium. 2.Aufl., Walter de
Gruyter u. Co, Berlin 1966.
- 111 MERCK DARMSTADT : Medizinisch-chemische
Untersuchungsmethoden. 10.Aufl.
1962. Herausgegeben von Firma E.
Merck AG, Darmstadt. Verlag Chemie,
Weinheim a.d.B.
- 112 MERCK DARMSTADT : Gesamteiweiß-Biuretmethode.
Firmensruckschrift zum Merkotestsatz.
- 113 MIES,H.J. : Einengung von Liquor cerebro-
spinalis als Vorbereitung zur Papier-

elektrophore, ein einfaches und schonendes Verfahren.

Klin.Wschr. 31, 159 (1953).

- 114 MISCHOL, H.R. : Methodik und Fehler bei der Bestimmung der sauren Serumphosphatasen.
Dtsch.Med.Wschr. 95, 1610 (1970).
- 115 MISCHOL, H.R. : Klinische Bedeutung einer Erhöhung der sauren Serumphosphatase.
Dtsch.Med.Wschr. 95, 1653 (1970).
- 116 MÜLLER, H., R.KLUTHE und A.ALEXANDROPOULOS :
Eine Mikromethode zur Bestimmung des "wahren" Kreatinins.
Z.klin.Chem. 8, 394 (1970).
- 117 NAGEL, W., F.WILLIG und F.H.SCHMIDT : Über die Aminosäure-Arylamidase -(sog. Leucaminopeptidase-) Aktivität im menschlichen Serum.
Klin.Wschr. 42, 447 (1964).
- 118 NIKOLAEW, W. und S.KRASTELEWSKI : Über den Mechanismus der Farbreaktion nach SALKOWSKI auf Cholesterin.
Biochem.z. 220, 253 (1930).
- 119 ORIOL-BOSCH, A. und K.D.VOIGT : Über die Anwendung einer Celluloseacetat-Folie für die Eiweißelektrophorese.
Klin.Wschr. 37, 758 (1959).
- 120 PIEPER, J. : Beiträge zur quantitativen Aus-

wertung von Papierelektropherogrammen.
Klin.Wschr. 36, 605 (1958).

- 121 PIRKE,K.M. und D.STAMM : Die Bestimmung von
 Natrium, Kalium und Kalzium im Harn mit
 einem Filterflammenphotometer.
 Z.klin.Chem. 8, 241 (1970).

- 122 POPPER,H., E.MANDEL und H.MEYER : Zur Kreatinin-
 bestimmung im Blute.
 Biochem.Z. 291, 354 (1937).

- 123 QUICK,A.J. : The hemorrhagic diseases. Charles
 C. Thomas, Springfield, Illinois, 1942.

- 124 RAPPOFORT,A.E. : Introduction to laboratory prob-
 lems : future trends. Relazione al VI
 Congresso Internazionale di Patologica
 Clinica, Ed. C.E.P.I. (Roma 1966).

- 125 REINER,M.,D.SELIGSON, et al. : Standard me-
 thods of clinical chemistry. Vol. I-
 V (1953 - 1965) Academic Press Inc.,
 Publishers New York-London.

- 126 RICHTERICH,R : Klinische Chemie. Akademische
 Verlagsgesellschaft, Frankfurt a.M. 1965

- 127 ROSEMUND,H. : Vorschrift des klinisch-che-
 mischen Labors des Kantonspitals Zürich
 für die Serumeisenbestimmung. Un-
 veröffentlicht.

- 128 SACHS,L. : Statistische Auswertungsmethoden.

2.Aufl.1969.Springer-Verlag Berlin,
Heidelberg, New York.

- 129 SCHELLONG,G. und U.WENDE : Mikromethode zur
Bestimmung des Serumbilirubins aus
Kapillarblut bei Neugeborenen.
Arch.Kinderheilkunde 162, 126 (1960).
- 130 SCHELLONG,G. und U.WENDE : Technik für die
Eichung von Methoden zur Serumbili-
rubinbestimmung.
Klin.Wschr.38, 703 (1960).
- 131 SCHETTLER,G. : Klinische Lipidforschung.
Z.klin.Chem. 1, 6 (1963).
- 132 SCHIRMEISTER,J., E.LANG und N.K.MAN : Serum-
harnstoff und Serumkreatinin als
Indikatoren der Nierenfunktion.
Med.Klinik 64, 1314 (1969).
- 133 SCHIRMEISTER,J., N.K.MAN, W.HALLAUER und H.GROPP :
Diskrepanz der Serumkonzentrationen
von Harnstoff und Kreatinin nach akutem
Nierenversagen.
Dtsch.Med.Wschr. 94, 482 (1969).
- 134 SCHNEIDER,K.W., E.R.HEISE und F.G.LEHMANN :
Klinische Untersuchungen über die
 α -Hydroxybutyratdehydrogenase und deren
Bedeutung für die Differenzialdiagnostik.
Enzymol.Biol.Klin. 4, 1 (1964).

- 135 SCHNEIDER, K.W., E.R. HEISE und F.-G. LEHMANN :
Die diagnostische Bedeutung Verschiedener Enzymreaktionen für die Diagnose des Herzinfarktes.
Med.Klin. 58, 2075 (1963).
- 136 SCHNEIDER, K.W., F.-G. LEHMANN und G. HORNING :
 α -Hydroxybutyrat- und Laktat-Dehydrogenase bei Lebererkrankungen.
Med.Klin. 60, 6 (1965).
- 137 SCHMIDT, F.H. : Die enzymatische Bestimmung von Glukose und Fruktose nebeneinander.
Klin.Wschr. 39, 1244 (1961).
- 138 SCHMIDT, F.W. : Aktuelle Probleme in der klinischen Biochemie.
Band I, Praktische Enzymologie, Grundlagen, Gesichertes und Grenzen. (2. Konferenz der Gesellschaft für Biologische Chemie 11./12. Feb. 1967, Heidelberg).
Verlag Hans Huber, Bern und Stuttgart, 1968.
- 139 SCHÖN, H. und W. ZELLER : Über die Bedeutung erhöhter Serumlipidwerte für die Atherogenese. Behandlungsmöglichkeiten.
Münch.Med.Wschr. 104, 2433 (1962).
- 140 SCHOENHEIMER, R. and W.M. SPERRY : A micro-method for the determination of free and combined cholesterol.
J.Biol.Chem. 106, 745 (1934).

- 141 SEELIG, H.P. : Die JAFFE-Reaktion mit Kreatinin,
Reaktionsprodukt und allgemeine Reak-
tionsbedingungen.
Z.klin.Chem. 7, 581 (1969).
- 142 SEVEN, J. and R.E.PETERSON : Spectrophotometric
determination of iron in urine, by
using 4, 7 diphenyl-1,10-phenanthroline.
Anal.Chem. 30. 2016 (1958).
- 143 SHERLOCK, S. : Liver disease. Churchill,
London 1951.
- 144 SHEWART, W.A. : Economic control of quality of
manufactured product. 9th printing,
Van Nostrand, Princeton (1932).
- 145 SIEGENTHALER, W. : Klinische Pathophysiologie.
Verlag Georg Thieme, Stuttgart 1970.
- 146 SLEIN, M.W., G.T.CORI and C.F.CORI : A
comparative study of hexokinase from
yeast and animal tissues.
J.Biol.Chem. 186, 763 (1950).
- 147 STAMM, D. : Control card techniques in quality
control compared with other statistical
methods. Zschr.anal.Chem. 243, 805 (1968).
- 148 STAMM, D. und H.BÜTTNER : Ringversuch zur
Qualitätskontrolle 1968.
Z.klin.Chem.7, 393 (1969).
- 149 STAMM, D. und R.HERRMANN : Mikrolitermethode
zur flammenphotometrischen Bestimmung

von Natrium, Kalium und Calcium mit handelsüblichen Geräten.

Z.klin.Chem. 3, 193 (1965).

- 150 STEGEMANN, H. und V. LOESCHKE : Mikrobestimmung von Stickstoff als Indophenolblau nach Chloramin-T-Oxydation.
Z.physiol.Chem. 329, 241 (1962).
- 151 STEVENSON, G.W., S.L. JACOBS and R.J. HENRY :
Studies on the determination of bile pigment : spectrophotometric determination of free and total bilirubin in serum. Clin.Chem. 10, 197 (1964).
- 152 STRAUMFJORD, J.V. and B.E. COPELAND : Clinical chemistry quality control values in thirty-three university medical school hospitals.
Amer.J.Clin.Path. 44, 252 (1965).
- 153 STURZENEGGER, V. und E.R. FROESCH : Eine neue, einfache und sehr informative Methode der Blutlipidbestimmung mit dem Nephelometer von STONE und THORP.
Schweiz.Med.Wschr. 98, 923 (1968).
- 154 SÜDHOF, H., H. STEINDORFF, CH. GÖTZE, I. VOSS und H. LÖHR : Zur Bestimmung der alkalischen und sauren Phosphatase im Serum.
Dtsch.Med.Wschr. 87, 249 (1962).
- 155 SZASZ, G. : Die Qualitätskontrolle von Enzymaktivitätsbestimmungen im Serum.
Z.klin.Chem. 8, 212 (1970).

- 156 SZASZ,G., P.ROSENTHAL und W.FRITZSCHE : Die
γ-Glutamyl-Transpeptidase-Aktivität im
Serum bei hepatobiliären Erkrankungen.
Dtsch.med.Wschr. 94, 1911 (1969).
- 157 TAMMES,A.R. and C.D.NORDSCHOW : An approach
to specificity in glucose determina-
tions. Am.J.clin.Path. 49, 613 (1968).
- 158 TECHNICON FRANKFURT : Firmendruckschrift zur
Glukosebestimmung mit dem Technicon-
Autoanalyser.
- 159 TECHNICON FRANKFURT : Firmendruckschrift zur
Harnstoff-Stickstoff-Bestimmung mit dem
Technicon-Autoanalyser.
- 160 TEORELL,T. : Spektrophotometrische Mikro-
bestimmung des Phosphors.
Biochem.Z. 230, 1 (1931).
- 161 WAUGH,W.H. : Utility of expressing serum
sodium per unit of water in assessing
hyponatremia.
Metabolism 18, 706 (1969).
- 162 WEBER,H. und T.WEGMANN : Atlas der klinischen
Enzymologie.
G.Thieme Verlag, Stuttgart 1968.
- 163 WELLER,H. : Die Verwendung derBERTHELOTschen
Reaktion auf Amoniak in der klinischen
Chemie.Teil I : Untersuchung der Reaktion
und ihre Empfindlichkeit.
Röntgen-und Laborpraxis 15, L77 (1962).

- 164 WELLER,H. : Die Verwendung der BERTHELOTschen Reaktion auf Ammoniak in der klinischen Chemie.Teil II : Die praktische Anwendung der Reaktion zur Bestimmung von Harnstoff, Rest-Stickstoff, Gesamt-Stickstoff und Ammoniak. Röntgen-und Laborpraxis 15, L142 (1962).
- 165 WHICHELOW,M.J., A.WIGGLESWORTH, B.D.COX, J.H. BUTTERFIELD and M.E.ABRAMS : Critical analysis of blood sugar measurements in diabetes detection and diagnosis. 16, 219 (1967).
- 166 WILKINS,D.H., A.A.SCHILT and G.SMITH : New substituted 1,10-phenanthrolines as ferroine and cuproine reacting ligands. Anal.Chem.27, 1574 (1955).
- 167 WILLIG,F., I.GREINER, H.STORK und F.H.SCHMIDT : Leucinaminopeptidase-(Arylamidase-) Aktivität im Serum. Bestimmung mit Leucin-p-Nitroanilid als Substrat. Klin.Wschr. 45, 474 (1967).
- 168 WROBLEWSKI,F. and J.S.LA DUE : Serum glutamic pyruvic transaminase SGPT in hepatic disease : a preliminary report. Ann.Int.Med. 45, 801 (1956).
- 169 WU,H. : Contribution to the chemistry of phosphomolybdic acids, phosphotungstic acids and allied substances. J.Biol.Chem. 43, 189 (1920).

- 170 YOUNG, D.M. and T.G.H. DRAKE : Automation in analytical chemistry.
Technicon Symposia, New York 1965.
- 171 ZEISS OBERKochen TAUNUS : Gerätebeschreibung des ABBE-Refraktometers, Firmendruck-schrift.
- 172 ZEISS OBERKochen TAUNUS : Arbeitsanleitung zum Flammenphotometer PF 5, Firmendruck-schrift.

Lebenslauf

Am 20. August 1944 wurde ich als Sohn des Studienreferendars Dr. phil. Erhard Marschner und seiner Frau Ilse, geb. Hoffmann, in Tetschen-Bodenbach (CSR) geboren.

Nach der Vertreibung aus der Tschechoslowakei 1945 lebten wir zunächst in Großgründlach bei Fürth i.B. Hier besuchte ich die ersten beiden Volksschulklassen, in Erlangen die dritte bis fünfte Klasse. 1955 trat ich in die Ohm-Oberrealschule in Erlangen ein. Von 1957 an besuchte ich die Gisela-Oberrealschule in München. 1964 legte ich dort die Reifeprüfung ab. Nach zwölfmonatiger Wehrdienstzeit erhielt ich 1965 die Zulassung zum Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität. Alle elf Semester meines medizinischen Studiums absolvierte ich hier. 1966 bestand ich das Vorphysikum und 1968 das Physikum. Im Jahre 1967 heiratete ich Brigitte Schwendy. Famuliert habe ich an der II.Medizinischen Universitätsklinik in München.

Im Juni 1971 beendete ich mein Medizinstudium mit dem Staatsexamen.

